

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

**Control de la proliferación celular y de la arquitectura
tisular por el oncogén aPKC en los epitelios de**
Drosophila melanogaster

Memoria Presentada por **Álvaro Román Fernández**

para optar al grado de Doctor en Ciencias

por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2014

Directora: **Dra. Sonsoles Campuzano Corrales**

Tutora: **Prof. Cristina Grande Pardo**

SUMMARY/ RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
I1. PRINCIPIOS DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO	9
I2. EL USO DE ORGANISMOS MODELO	10
I2.1 <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	10
I2.1.1 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
I2.1.2 Células imaginales	12
I2.1.3 El disco de ala	13
I3. ORGANIZACIÓN TISULAR EN EPITELIOS: POLARIDAD CELULAR APICOBASAL	14
I3.1 Polaridad celular	15
I3.2 Establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular apicobasal	18
I4. LA PROTEÍNA QUINASA C ATÍPICA.....	19
I5. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS: CONTROL DEL TAMAÑO Y DE LA MORFOLOGÍA	20
I6. ALTERACIONES EN EL DESARROLLO: TUMOROGÉNESIS	22
I6.1 Tumores en <i>Drosophila</i>	22
I6.2 La vía de Salvador-Warts-Hippo (SWH)	24
I6.3 Función de los determinantes de polaridad basolaterales como supresores de tumores	26
I6.4 Función de los determinantes de polaridad apicales en la tumorigénesis.....	27
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES & MÉTODOS	35
M1. ANÁLISIS GENÉTICO	37
M1.1 Cepas de <i>Drosophila</i>	37
M1.2 Métodos	39
M1.2.1 Cultivo de <i>Drosophila</i>	39
M1.2.2 Sobreexpresión y expresión ectópica controlada mediante los métodos Gal4/UAS y Gal4/Gal80/UAS.....	39
M1.2.3. Técnicas de análisis clonal.....	41
M1.2.3.1 Generación de clones de falta de función por recombinación mitótica .	41
M1.2.3.2 Generación de clones Minute	43

M1.2.3.3 Generación de clones MARCM.....	43
M1.2.3.4 Generación de clones de ganancia de función (clones en cis o clones flp-out)	44
M2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR	45
M2.1. Inmunohistoquímica.	45
M2.1.1 Inmunofluorescencia.	45
M2.1.2 Marcaje de núcleos con ioduro de propidio	46
M2.1.3 Análisis de la proliferación celular	46
M2.1.4 Análisis de apoptosis.....	47
M2.1.5 Hibridación in situ	48
M2.2. Montaje de estructuras adultas.....	49
M2.3. Obtención de perfiles de ciclo celular.....	49
M2.4. Cultivo de células.....	50
M3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	50
M3.1. Análisis de DNA.....	50
M3.2 Extracción de proteínas	51
M3.3 Cuantificación de proteínas	51
M3.4. Ensayo de defosforilación.....	51
M3.5. Ensayo de inhibición de PKC	51
M3.6. Separación de proteínas por PAGE	52
M3.7. Western Blot	52
M4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO	53
M4. 1 Microscopía óptica.....	53
M4.2 Microscopía laser confocal	53
M5. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	54
RESULTADOS.....	55
R1. La sobreexpresión de DaPKC constitutivamente activa causa el sobrecrecimiento de los discos imaginales de ala.....	57
R1.1 El crecimiento excesivo de los discos imaginales asociados a la sobreexpresión de DaPKC ^{CAAXwt} se debe a su actividad como proteína quinasa	57
R1.2 La sobreexpresión de aPKC-CA en amplias regiones de los discos imaginales y en epitelio folicular causa su crecimiento excesivo y distorsiona la estructura del epitelio .	60

R1.3 aPKC-CA incrementa la proliferación celular.....	61
R1.4 La reducción del ritmo de proliferación celular por la sobreexpresión de <i>dacapo</i> revierte el fenotipo asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA.....	64
R1.5 La sobreexpresión de DaPKC-CA induce la muerte celular por apoptosis.....	65
R1.6 La presencia de discos de ala mutantes para <i>aPKC-CA</i> prolonga el desarrollo larvario	68
R1.7 Alteraciones en la polaridad apicobasal y la adhesión intercelular asociadas a la sobreexpresión de aPKC-CA.....	69
R1.8 Las células que sobreexpresan aPKC-CA muestran capacidad invasiva	70
R1.9 Los clones de células que sobreexpresan aPKC-CA son eliminados del epitelio del disco imaginal de ala	72
R1.10 La sobreexpresión de dMyc no aumenta la supervivencia de los clones aPKC-CA situados en la región presuntiva de ala	76
R2. Mecanismo molecular del sobrecrecimiento asociado a la sobreexpresión de DaPKC constitutivamente activa en el disco de ala.....	80
R2.1 La sobreexpresión de aPKC-CA en el disco de ala inhibe la actividad de la vía de Salvador/Warts/Hippo	80
R2.1.1 Análisis de epistasia entre aPKC y diversos componentes de la vía SWH.....	82
R2.1.2 Interacción de <i>aPKC</i> con <i>yki</i>	82
R2.1.3 Interacción de <i>aPKC</i> con <i>hippo</i>	85
R2.1.4 Interacción de aPKC con <i>capping protein A</i>	85
R2.1.5 Interacción de <i>aPKC</i> con <i>kibra</i>	87
R2.1.6 Interacción de <i>aPKC</i> con <i>ex</i>	87
R2.1.6.1 La sobreexpresión de aPKC-CA reduce los niveles de Expanded y afecta a su localización subcelular	87
R2.1.6.2 Expanded como posible diana de fosforilación de aPKC.....	89
R2.1.7 aPKC-CA puede reprimir la vía de SWH al inhibir la actividad de Lgl.....	91
R2.2 aPKC-CA activa la vía de JNK	92
R2.3 aPKC-CA activa la vía de Notch	93
R3. Análisis de la falta de función de aPKC en el disco imaginal de ala.	96
R3.1 aPKC se requiere para la viabilidad de las células de los discos imaginales	96
R3.2 Polaridad apicobasal de las células del disco de ala mutantes para <i>aPKC</i>	100
R3.3 La disminución en los niveles de DaPKC no altera la proliferación celular.....	101

R3.4 No se aprecian alteraciones en las vías de Notch y SWH en condiciones de falta de función de aPKC en el disco de ala	103
DISCUSIÓN	105
D1. Cáncer en <i>Drosophila</i>	107
D2. La proteína quinasa C atípica es un oncogén en mamíferos y <i>Drosophila</i>	108
D2.1 aPKC-CA incrementa la proliferación celular	110
D2.2 aPKC afecta levemente a la diferenciación celular	111
D2.3 Migración e invasión asociada a la actividad excesiva de aPKC	112
D2.4 aPKC-CA altera la polaridad y la arquitectura tisular	113
D2.5 La desregulación de aPKC causa apoptosis	113
D2.6 Causas de la muerte celular asociada a la sobreexpresión de aPKC-CA	114
D3. Mecanismos moleculares de la hiperproliferación asociada a aPKC-CA	116
D3.1 Inactivación de la vía de SWH	116
D3.1.1 La fosforilación de Expanded no parece depender de aPKC	118
D3.1.2 La inactivación de lgl por aPKC como mecanismo de la represión de la actividad de la vía de SWH por esta quinasa	119
D3.2 La activación de la vía de JNK por aPKC contribuye al fenotipo tumoral	120
D3.3 Activación de la vía de Notch por aPKC	121
CONCLUSIONES	123
ANEXOS	127
ABREVIATURAS	143
BIBLIOGRAFÍA	149

SUMMARY /
RESUMEN

Human atypical protein kinase C ι (PKC ι or PKC λ in mice) is overexpressed in many cancer types of epithelial origin. PKC ι participates both in the induction and progression of cancer, and accordingly, it is considered to be an oncogene. PKC ι / λ presents a large variety of phosphorylation targets and it is involved in several carcinogenesis related processes such as MAPK-dependent cell proliferation control, apoptosis control and the establishment and maintenance of epithelial apicobasal cell polarity. There is just one aPKC isoform in *Drosophila*, termed DaPKC. We have previously shown how DaPKC regulates the establishment of apicobasal cell polarity in the *Drosophila* embryo partly, through phosphorylation of the intracellular domain of Crumbs, another apical determinant. On the other hand, our previous results and those from other groups showed that overexpression of a constitutively active form of the aPKC (CA-aPKC) in the imaginal discs caused their massive overgrowth.

To gain further insight into the mechanism(s) underlying the overgrown discs phenotype, which resembles tumoral growth, we examined in detail the effects of overexpressing CA-aPKC. First, we observed an increase in cell proliferation linked to the upregulation of Cyclin E levels, which facilitates the cell cycle G1 to S transition. Furthermore, the mutant cells display other hallmarks of cancer such as invasiveness and loss of cell polarity. At the molecular level, CA-aPKC activates cell proliferation through inactivation of the Salvador-Warts-Hippo (SWH) pathway, namely affecting the localization and accumulation of Expanded, and through activation of the c-Jun N-terminal (JNK) signal transduction pathway. Activation of the Notch pathway by CA-aPKC apparently does not play a major role in the tumoral overgrowth generated with this model.

Our results indicate the requirement of a tight regulation of aPKC protein levels and location for normal development, since their increased activity triggers tumoral overgrowth while its loss causes cell death.

La proteína quinasa humana PKC ι (o PKC λ en el ratón) se encuentra sobreexpresada en numerosos tipos de cáncer de origen epitelial. PKC ι interviene tanto en la iniciación como en la progresión tumoral y por ello se considera un oncogén. PKC ι / λ presenta numerosos sustratos de fosforilación y está implicada en varios procesos relacionados con carcinogénesis tales como el control de la proliferación celular, dependiente de la vía de MAPK, y de la apoptosis y en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad apicobasal de las células epiteliales. En *Drosophila* sólo existe una isoforma, DaPKC. Previamente hemos demostrado que DaPKC regula el establecimiento de la polaridad apicobasal en el ectodermo embrionario de *Drosophila* y cómo lo hace, en parte al menos, a través de la fosforilación de Crumbs, otro determinante de polaridad, en su dominio intracelular. Por otro lado, nuestros datos previos y los de otros autores indicaban que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de la quinasa DaPKC (aPKC-CA) en el epitelio del disco imaginal de ala causaba un gran incremento de su tamaño.

Con el fin de entender la(s) causa(s) de este sobrecrecimiento de los discos imaginales, que se asemeja a un crecimiento tumoral, investigamos en detalle los efectos de la sobreexpresión de aPKC-CA. En primer lugar observamos que causa un incremento de la proliferación celular asociado a mayores niveles de expresión de Ciclina E, lo que facilita la transición G1-S del ciclo celular. Además, las células mutantes presentan otras características tumorales como capacidad invasiva y pérdida de polaridad. A nivel molecular, DaPKC-CA activa la proliferación celular por inactivación de la vía de Salvador-Warts-Hippo (SWH), concretamente deslocalizando y bajando los niveles de la proteína Expanded, y por activación de la vía de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK). La activación de la vía de Notch no parece influir de modo crítico en los sobrecrecimientos tumorales generados en este modelo.

Nuestros resultados indican que para el desarrollo normal se requiere una fina regulación de la localización y concentración de aPKC, puesto que el aumento de su actividad lleva a crecimientos tumorales y su pérdida supone la muerte celular.

INTRODUCCIÓN

II. PRINCIPIOS DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

"La célula es la unidad básica de la organización biológica y todos los organismos vivos están formados por células". "Las células de los organismos pluricelulares se originan por división a partir de otras células precursoras todas ellas procedentes de una única célula, el cigoto". Estas afirmaciones, extrapoladas de la conocida como teoría celular (Schleiden, 1838; Schwann, 1839; Virchow, 1859; revisado en Baluska *et al.*, 2004) , son hoy casi un axioma. Sin embargo, su postulación en el siglo XIX supuso una revolución en muchos aspectos de la Biología. La teoría celular cerraba una discusión histórica en la Embriología dando respuesta a la cuestión planteada por Aristóteles 2000 años atrás -en los primeros estudios conocidos de Embriología- sobre la naturaleza del embrión. Para los teóricos preformistas los embriones no eran más que fases en crecimiento de un organismo ya preformado desde el origen u *homúnculo*. La teoría de la Epigénesis defendida por Aristóteles, postulaba sin embargo que los organismos se formaban *de novo* en cada generación.

La célula es asimismo la unidad fisiológica de un ser vivo, ya que en una sola célula caben todas las funciones vitales. El salto de la unicelularidad a la pluricelularidad supuso un fascinante avance en la evolución. A pesar de que se pueden encontrar ejemplos de asociación o pluricelularidad en procariotas, no es hasta la radiación evolutiva del reino de los protistas (posiblemente debido a procesos de endosimbiosis seriadas (Margulis, 1975), cuando empiezan a explotarse las posibilidades adaptativas que ofrecen los organismos constituidos por múltiples células. La multicelularidad plantea algunos problemas, pues la relación entre superficie y volumen disminuye y las células más alejadas del medio externo tienen un complicado acceso a los nutrientes y un problema de eliminación de residuos, por ello la evolución de los organismos pluricelulares les lleva a la especialización de sus células para desempeñar determinadas funciones, dando lugar a distintos niveles de organización (tejidos, órganos, sistemas). Se cree que hace unos 1000 millones de años comenzó dicha especialización, encontrándose en el periodo Ediacárico los primeros fósiles de organismos pluricelulares con diferenciación de tejidos (de unos 570 millones de años de antigüedad).

La célula es también la unidad genética. Cada célula de un organismo contiene toda la información hereditaria necesaria para controlar su ciclo vital y su desarrollo y para la transmisión de esa información a la siguiente generación. Sin embargo, solamente emplea parte de esa información. Esta expresión génica diferencial está controlada por factores extrínsecos a las células y por la interacción de las mismas con sus células vecinas y con la

INTRODUCCIÓN

matriz extracelular. La expresión diferencial de los genes regula el desarrollo normal del organismo mediante la integración ordenada, en el espacio y en el tiempo, de señales de especificación, determinación y diferenciación de los destinos celulares, de proliferación celular y de apoptosis. De este modo, a partir de una sola célula indiferenciada (huevo o cigoto) pueden generarse organismos completos de millones de células diferenciadas, pasando por distintos estadios embrionarios y juveniles hasta la forma adulta en la que podrá reproducirse y perpetuar el ciclo vital. Del estudio de estos procesos se encarga la Biología del desarrollo. Esta disciplina está muy relacionada con la Embriología y la Genética, redefinidas por Morgan en la década de 1920 como expresión de los rasgos heredados y transmisión de dichos rasgos, respectivamente.

12. EL USO DE ORGANISMOS MODELO

La Biología del desarrollo y la Biología evolutiva se han estudiado conjuntamente durante muchos años (von Baer, 1828; Darwin, 1859; Haeckel, 1896). En la década de 1980, los avances en las técnicas de Biología molecular (PCR y secuenciación masiva de genomas entre otros) permitieron elaborar árboles filogenéticos basados en secuencias de RNA ribosómico (Field *et al.*, 1988) (a diferencia de las clasificaciones anteriores basadas en comparaciones estructurales y análisis de fósiles) y sobre todo, ayudaron a demostrar que a pesar de la gran variedad de estructuras, formas y planes corporales, hay una conservación del material genético y de los mecanismos moleculares que dirigen los procesos biológicos fundamentales en especies tan distintas como nematodos, insectos y mamíferos (Lawrence, 1992; Holland, 1999; Carroll *et al.*, 2001). Por ello, el estudio de los procesos biológicos y su alteración en organismos modelo permite inferir o extrapolar los resultados a organismos más complejos y dilucidar las bases moleculares de la fisiopatología y las causas de las enfermedades humanas. Entre los organismos modelo más empleados se encuentran vertebrados como la rana africana *Xenopus laevis*, el pollo *Gallus gallus*, el pez cebra *Danio rerio*, el ratón *Mus musculus*, o invertebrados como el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, animal modelo empleado en la realización de esta Tesis Doctoral.

12.1 *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Empleada como organismo modelo desde los inicios del siglo XX por la escuela de Thomas Hunt Morgan, *Drosophila melanogaster* es el organismo de estudio preferido por los

genetistas. Entre sus ventajas cuenta con su pequeño tamaño (mide alrededor de 3 mm) que facilita su almacenamiento y mantenimiento, la corta duración de su ciclo de vida (de unos 10 días a 25 °C, Figura I1), o su abundante progenie. Pero son sus características genéticas las que han favorecido su uso: Todo su material genético está contenido en 4 pares de cromosomas, no se da la recombinación meiótica en los machos y además apenas presenta redundancia génica en comparación con los vertebrados, por lo que el estudio de la función de sus genes se simplifica. Por otro lado, se han desarrollado una gran variedad de herramientas que permiten el control de la expresión génica (por sobreexpresión o silenciamiento) y su análisis (por ej. la hibridación *in situ*) lo que unido al uso de los cromosomas balanceadores (cromosomas con múltiples inversiones asociadas a mutaciones que causan fenotipos fácilmente reconocibles) que permiten el mantenimiento y seguimiento de estirpes mutantes a lo largo de las generaciones, facilitan el estudio de la función de los genes y de su regulación (Sullivan *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 2005). El genoma de *D. melanogaster* fue uno de los primeros completamente secuenciados y se ha demostrado que a pesar de sus (evidentes) diferencias morfológicas con el hombre, un 70% de los genes responsables de enfermedades humanas conocidas tienen ortólogos en *Drosophila* (Fortini *et al.*, 2000; St Johnston, 2002; Bier, 2005).

I2.1.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Se pueden distinguir cuatro estadios a lo largo del ciclo de vida de los insectos holometábolos como *Drosophila melanogaster*: Embrión, larva, pupa e imago (Figura I1). Durante la reproducción sexual de los imagos (adultos) se produce la fecundación del cigoto, comenzando el desarrollo del nuevo individuo. En el estadio de embrión -de unas 24 horas de duración- se producen las primeras etapas del desarrollo tales como la segmentación, gastrulación u organogénesis. Tras el desarrollo embrionario eclosiona una larva que pasa por tres estadios larvarios secuenciales a lo largo de unos 4 días (LI, LII y LIII) controlados por pulsos de liberación de hormonas (Thummel, 2001; Tennessen y Thummel, 2011). Finalmente la larva detiene su movimiento, su cutícula se oscurece y endurece formando el *puparium*, y experimenta una muda metamórfica donde los tejidos larvarios son sustituidos por tejidos adultos, proceso conocido como metamorfosis. Tras el estadio de pupa, de unos 5 días de duración, eclosiona el imago, que será fértil en unos dos días y durante el resto de su vida adulta (Lawrence, 1992).

INTRODUCCIÓN

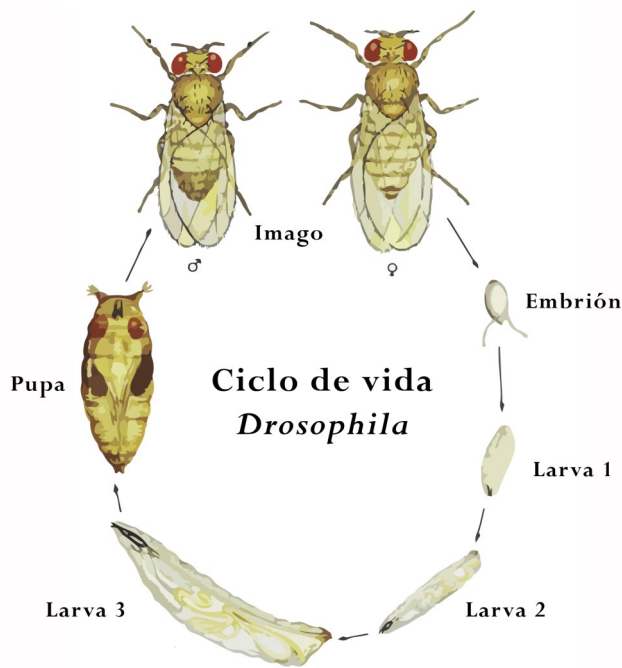


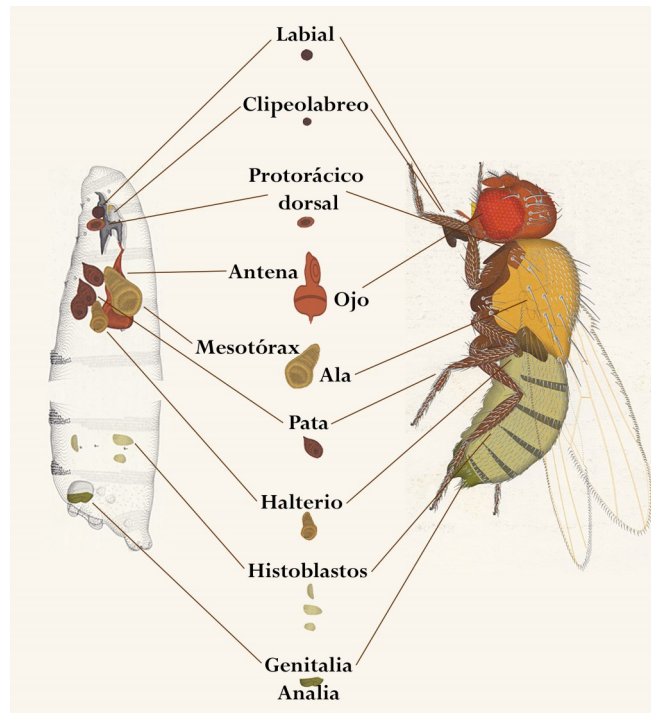
Figura I1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. La duración del ciclo de vida de la mosca del vinagre depende de varios factores, pero principalmente de la temperatura, completándose en aproximadamente 10 días a 25 °C. Se pueden distinguir cuatro estadios: Embrión, larva, pupa e imago. Imagen modificada de Flagg (1988).

I2.1.2 Células imaginales

Durante la pupación, la mayoría de los tejidos específicos de la larva se destruyen mientras que se desarrollan nuevos órganos del adulto desde nidos de células imaginales. Hay tres tipos de células imaginales, (a) aquéllas que se mantienen dentro de los órganos vitales de la larva y que irán formando el órgano adulto a medida que el larvario degenera, (b) los nidos de histoblastos, que dan lugar a la estructura cuticular del abdomen en el adulto y (c) los discos imaginales, que darán lugar a las estructuras externas del adulto (Bate y Arias, 1991).

Hay 21 discos imaginales en *Drosophila* (Figura I2). Tienen forma de saco aplanado con dos capas de células epiteliales enfrentadas por la cara apical, quedando un lumen entre ambas: Una de las capas presenta la forma de un epitelio columnar pseudoestratificado (el disco propio), del que derivan la mayoría de las estructuras adultas; mientras que la otra es un epitelio plano (membrana o epitelio peripodial) que desempeña un papel más estructural, ayudando a la eversión de los discos (Pastor-Pareja *et al.*, 2004). Hay un tercer tipo de células de morfología cuboidal en la transición de un epitelio al otro (McClure y Schubiger, 2005). Por último, se encuentran asociadas a los discos las células adepteliales, de origen mesodérmico, que darán lugar a las fibras musculares (Reed *et al.*, 1975; Holz *et al.*, 1997). Al contrario que los histoblastos que sólo proliferan durante la pupación, las células de los discos imaginales proliferan activamente durante el periodo larvario (García-Bellido y Merriam, 1971).

Figura I2. Estructuras cuticulares externas del adulto derivadas de nidos imaginales. La cápsula cefálica, la probóscide, las antenas, los ojos, el palpo maxilar, el mesotórax o notum, el metatórax, las alas, los halterios y las estructuras axilares que los conectan con el tórax, las patas y la genitalia derivan de discos imaginales; la estructura cuticular del abdomen procede de los histoblastos. Modificado a partir de imágenes obtenidas en www.flybase.org.



I2.1.3 El disco de ala

El disco de ala o disco mesotorácico dorsal es posiblemente el más estudiado de todos los discos imaginales (Figura I3). El primordio de disco de ala procede de un grupo de unas 50 células que se invaginan del ectodermo del segundo segmento torácico del embrión (Bate y Arias, 1991) y contiene células con identidad posterior (que les confiere la expresión del gen selector *engrailed* (*en*)) o anterior (que no expresan *en*) (Kornberg, 1981) (Figura I3A). Estas células darán lugar a los compartimentos posterior y anterior del disco de ala. Los compartimentos están formados por grupos de células con unas características de afinidad que les hacen minimizar sus contactos con células del compartimento adyacente (García-Bellido *et al.*, 1973; García-Bellido *et al.*, 1979). Durante el estadio de larva II se establecen los compartimentos dorsal (D) y ventral (V) por la expresión diferencial del gen selector *apterous* (*ap*) en las células del compartimento dorsal (Díaz-Benjumea y Cohen, 1993; Blair *et al.*, 1994) (Figura I3A). Los bordes entre compartimentos se comportan como organizadores territoriales mediante la liberación de los morfógenos Decapentaplegic (Dpp) y Wingless (Wg) que dirigen la formación de patrón y el crecimiento del disco imaginal (Capdevila y Guerrero, 1994; Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Zecca *et al.*, 1995; Zecca *et al.*, 1996; Neumann y Cohen, 1997). Además, hay otras subdivisiones en el disco de ala que no están asociadas, como los compartimentos, a una restricción de linaje (Mann y Morata, 2000), como son las regiones presuntivas de ala, axila alar y notum (o mesotórax), esta última definida por la expresión de los genes del complejo Iroquois (Díez del Corral *et al.*, 1999) (Figura I3 B).

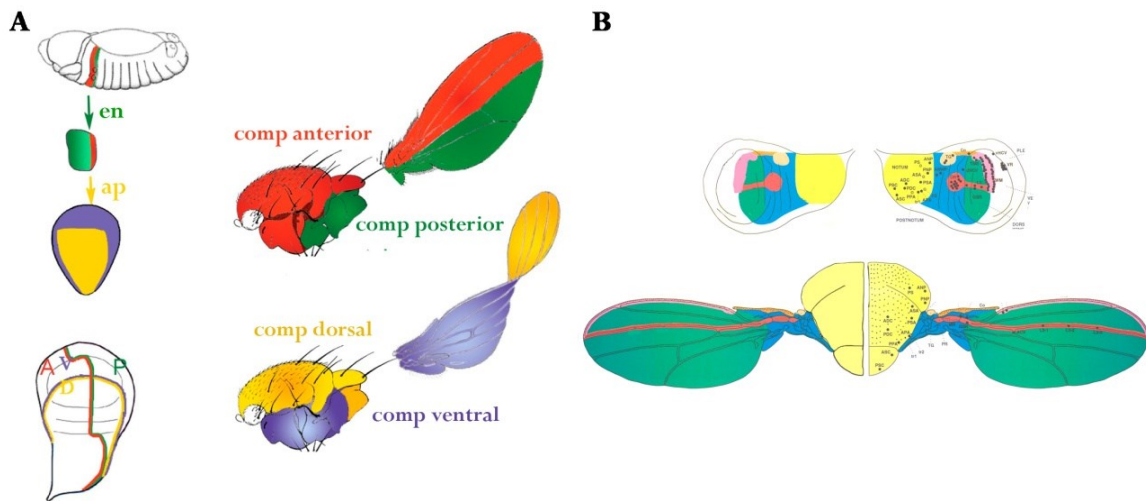


Figura 13. Adquisición de la identidad celular en el disco imaginal de ala. (A) Especificación de compartimentos. (Izquierda) De arriba abajo, se muestran distintas etapas del desarrollo del disco de ala: la especificación del primordio del disco en el ectodermo embrionario, la compartimentalización antero-posterior (las células que conforman el compartimento posterior definidas por la expresión de *engrailed* (*en*) en verde, las del compartimento anterior en rojo); la compartimentalización dorso-ventral por la expresión de *apterous* (*ap*) en ocre en el compartimento dorsal (el compartimento ventral se marca en morado). Las estructuras adultas derivadas están marcadas en el mismo color. (B) Especificación de territorios. Mapa de destino del disco de ala en el que se muestran, marcadas en el mismo color, las células que componen los territorios presuntivos de ala dorsal, notum y axila alar y las correspondientes estructuras adultas, modificado de Campuzano y Modolell, (1992).

13. ORGANIZACIÓN TISULAR EN EPITELIOS: POLARIDAD CELULAR APICOBASAL

Los epitelios son tejidos de origen temprano, tanto filogénicamente (aparecen muy pronto en la evolución de los Metazoos) como ontogénicamente. Desempeñan funciones secretoras y de absorción y actúan como barreras que segregan el medio interno del medio ambiente externo. Las uniones que se establecen entre las células epiteliales, junto a su versatilidad funcional y habilidad para adoptar distintas formas, hacen del epitelio un tejido fundamental para la organogénesis y la evolución de los planes corporales de los animales complejos (revisado en Tepass *et al.*, 2001; Tepass, 2012; Rodríguez-Boulan y Macara, 2014). Por otro lado, las células epiteliales presentan una gran plasticidad pudiendo perder su fenotipo epitelial, en lo que se denomina la transición epitelio-mesénquima (EMT) y de modo recíproco, efectuar la transición mesénquima-epitelio (MET). Estos procesos, que tienen lugar durante el desarrollo normal, también están implicados en la metástasis de las células tumorales (revisado en Thiery *et al.*, 2009).

I3.1 Polaridad celular

La formación y función de los epitelios depende de la generación y mantenimiento de una polaridad ápico-basal de las células que los componen. Esta polaridad celular se basa en la distribución asimétrica de lípidos y proteínas en su membrana plasmática, de componentes del citoesqueleto y de los orgánulos celulares a lo largo de un eje apicobasal y requiere el establecimiento de uniones entre las células epiteliales y entre éstas y la matriz extracelular además de un tráfico vesicular polarizado (Li y Gundersen, 2008; Mellman y Nelson, 2008).

La célula epitelial presenta dominios de membrana con funciones específicas (Figura I4 B): el dominio apical, que se enfrenta al exterior o al lumen en el caso de epitelios que recubren cavidades internas o túbulos, y el dominio basolateral, que contacta con las células adyacentes y con la matriz extracelular. Entre ambos y conectando a las células epiteliales entre sí se encuentran las uniones adherentes. En el dominio apical de las células de vertebrados se encuentran las uniones estrechas (TJ, de *Tight Junctions* en inglés) que ejercen una función de barrera paracelular limitando el paso de solutos a través del epitelio a la vez que impiden la difusión ápico-basolateral de los componentes de la membrana (revisado en (Balda y Matter, 2009)). En las células de *Drosophila* las uniones septadas, situadas en el dominio basolateral, llevan a cabo la función de barrera. El mantenimiento de la polaridad ápico-basal es esencial para múltiples procesos celulares tales como la división celular asimétrica, la supervivencia, la diferenciación y para los cambios morfológicos y la migración (Bryant y Mostov, 2008).

Estudios genéticos realizados en *S. cerevisiae*, *C. elegans* y *D. melanogaster* identificaron los principales determinantes de polaridad, proteínas que presentan una distribución asimétrica en las células y cuya correcta localización en los diferentes dominios de la membrana plasmática es esencial para el mantenimiento de la polaridad en *Drosophila* y vertebrados. Algunas de estas proteínas se descubrieron por su función en el reparto de componentes citoplasmáticos durante la primera división del embrión de *C. elegans* y reciben por ello el nombre de proteínas Par (por *Partitioning defective*) (Kemphues *et al.*, 1988). El número de determinantes de polaridad y la complejidad de sus interacciones aumenta según se progresa en el estudio de este proceso. Actualmente se considera que en *C. elegans* hay 69 proteínas relacionadas con la polaridad apicobasal (T. Koorman, comunicación personal). A pesar de las diferencias estructurales existentes entre los epitelios de mamíferos y artrópodos (Figura I4), la mayoría de los determinantes de polaridad están conservadas en todos los Metazoos (revisado en Goldstein y Macara, 2007; Assemat *et al.*, 2008; Yamanaka y Ohno, 2008; Tepass, 2012; Rodríguez-Boulán y Macara, 2014).

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente los determinantes de polaridad se han agrupado en tres complejos diferenciados, dos apicales y uno basolateral. En el dominio apical se encuentran los complejos Crumbs (Crb), formado por Crb (Crb1-3 en mamíferos), Stardust (Sdt, PALS1, *Protein associated with lin seven 1* mamíferos), dPatj (*Pals1-associated Tight Junctions protein*), MUPP1, (*Multi-PDz domain Protein 1* en mamíferos) y Lin-7; y el complejo Bazooka (Baz), formado por Baz (Par3 en mamíferos), Par6 (con tres ortólogos en mamíferos, Par6a, b y g), la Rho GTPasa cdc42 (*cell division defective 42*) y la proteína quinasa C atípica (DaPKC en *Drosophila*, PKC ζ /t en mamíferos) (Figura I4 B).

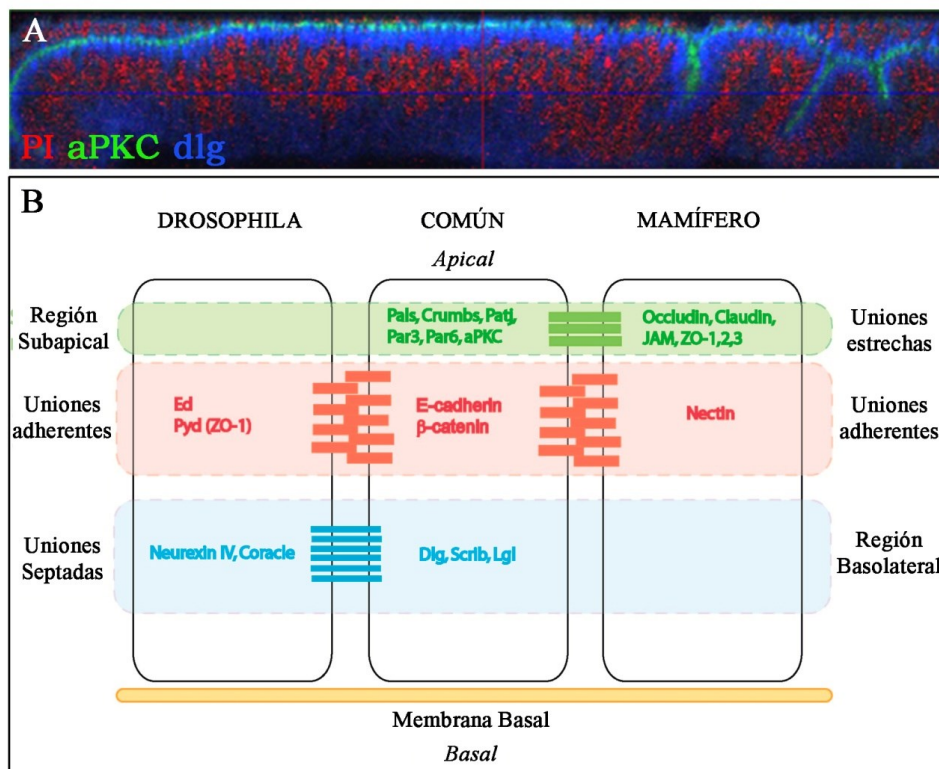


Figura I4. (A) Sección óptica transversal de un disco imaginal de ala mostrando la distribución de aPKC (verde, apical) y Dlg (azul, basolateral). Los núcleos están teñidos en rojo con Ioduro de Propidio. (B) Esquema de los distintos dominios de la membrana de una célula epitelial, mostrando la localización de algunos reguladores de la polaridad ápico-basal, basado en Humbert *et al.*, (2003).

Cbr es una proteína transmembrana con un extenso dominio extracelular y un corto dominio intracelular (de 37 aminoácidos) denominado Crb-intra (Crb-i) en el cual reside su función como determinante de polaridad (Tepass *et al.*, 1990; Klebes y Knust, 2000). Crb presenta en la región yuxtamembrana un dominio de unión a proteínas de la familia FERM (acrónimo formado a partir del nombre de cuatro proteínas que contienen este dominio: 4.1, Ezrin, Radixin y Moesin), denominado *FERM-protein Binding domain* o FBD y por su extremo C-terminal ERLI se une a proteínas con dominios PDZ (derivado de los nombres

de las proteínas: Post synaptic density protein (PSD95), Discs large (Dlg) y Zonula occludens-1 (ZO-1), denominada PBD (por *PDZ-protein Binding Domain*) (Klebes y Knust, 2000). Crb se une al dominio PDZ de Sdt a través de su PBD, mientras que Sdt, a su vez, lo hace a PATJ y Lin-7 (revisado en). La proteína FERM Moesin (Moe), que se puede unir al dominio FBD de Crb (Medina *et al.*, 2002) y al citoesqueleto de actina (Polesello *et al.*, 2002) también se considera integrante del supercomplejo apical.

A medida que se avanza en el conocimiento de la regulación de la polaridad apicobasal se observa que la composición de los complejos apicales es muy dinámica, estableciéndose una red de interacciones físicas entre varios de sus componentes a lo largo del desarrollo (Bulgakova y Knust, 2009). Por ejemplo aPKC/Par6 interacciona con el complejo Crb por la unión de Par6 a Crb (Kempkens *et al.*, 2006) o a Sdt (Wang *et al.*, 2004) y puede interaccionar también por la unión directa de aPKC a Crb-i y PATJ, demostrada en experimentos *in vitro* (Sotillos *et al.*, 2004).

Adicionalmente, en células de vertebrados se localizan en el dominio apical como componentes de las uniones estrechas las proteínas transmembrana Occludin, Claudin y JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) y las proteínas adaptadoras ZO-1, 2 y 3 (Figura I4).

Las proteínas integrantes del dominio basolateral son Lethal Giant Larvae (Lgl, Hugl 1 y 2 en mamíferos), Scribble (Scrib y hScrib), Discs large (Dlg y sus ortólogos Dlg1-3 en mamíferos), la serín treonín quinasa Par1 y 14-3-3 (Par5), (revisado en Yamanaka y Ohno, 2008; Tepass, 2012) (Figura I4 B). En *Drosophila* Yurt, Neurexina IV, Coracle y la Na^+K^+ ATPasa se consideran también determinantes basolaterales (Laprise *et al.*, 2009). Por otro lado la fosfatasa de lípidos PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*), localizada en apical, y la quinasa PI3K (fosfoinositol 3 quinasa), asociada a la membrana basolateral, ayudan al mantenimiento de los dominios de la membrana generando una asimetría en la distribución de los fosfatidil-inositol-fosfatos PIP2 y PIP3 (Comer y Parent, 2007).

En las uniones adherentes se establecen interacciones homotípicas célula-célula mediadas por la proteína transmembrana Cadherina-E que contacta con el citoesqueleto de actina a través de moléculas de α -catenina y β -catenina (revisado en Kim *et al.*, 2011; Maitre y Heisenberg, 2013). En *Drosophila*, la proteína transmembrana Echinoid (Ed) y Baz también son componentes de las uniones adherentes (Wei *et al.*, 2005; Morais-de-Sa *et al.*, 2010).

13.2 Establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular apicobasal

El establecimiento de la polaridad apicobasal de las células epiteliales se lleva a cabo por distintos mecanismos según el contexto celular (St Johnston y Ahringer, 2010). Experimentos realizados con células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), una línea celular epitelial prototípica, sugieren la necesidad de adhesiones intercelulares o de las células con la matriz extracelular para el establecimiento de la polaridad ápico basal. A través de las uniones adherentes se recluta a Par-3, que se une a su vez a Afadina y Cadherinas (Ooshio *et al.*, 2007), y posteriormente se forman las uniones estrechas. Los lípidos fosfatidilinositol fosfato PIP2 y PIP3 desempeñan un papel muy importante en el establecimiento del dominio apical durante la formación de cistos de células epiteliales. PIP2 se acumula en la membrana apical mientras que PIP3 lo hace en basolateral. PIP2 recluta Anexina 2, que se une a cdc42-GTP, y activa al complejo Par-6/aPKC (Martin-Belmonte *et al.*, 2007). Por otra parte, el epitelio embrionario de *Drosophila* establece su polaridad antes de y durante la celularización del blastodermo (Mavrakakis *et al.*, 2009). Baz, localizada en el borde lateral, recluta a la Cadherina-E para la formación de las uniones adherentes (Harris y Peifer, 2004; McGill *et al.*, 2009). Posteriormente Par-6 y aPKC se unen a Baz para estabilizar estas uniones (Harris y Peifer, 2004; Harris y Peifer, 2005; Harris y Tepass, 2008). Más tarde, durante la gastrulación se sintetiza Crb que interacciona cooperativamente con los otros determinantes apicales para estabilizar el dominio apical y las uniones adherentes (Tepass *et al.*, 1990; Sotillos *et al.*, 2004). Los epitelios secundarios (que derivan de una transición mesénquima-epitelio) se polarizan de un modo más parecido al de las células MDCK pues necesitan guías basales (lamininas) (revisado en St Johnston y Ahringer, 2010).

Los componentes de los complejos apicales por un lado y de los basolaterales por otro son interdependientes para su localización en los dominios de membrana correspondientes. Además, el mantenimiento de los distintos dominios depende de la regulación negativa y exclusión mutua entre los componentes apicales y basolaterales (Hutterer *et al.*, 2004; St Johnston y Ahringer, 2010). Así, si faltan Lgl, Scrib o Dlg las proteínas apicales se deslocalizan, pudiendo encontrarse en localizaciones basolaterales (Woods *et al.*, 1997; Bilder y Perrimon, 2000; Tanentzapf y Tepass, 2003). De modo similar, la proteína basolateral Yurt inactiva a aPKC en este dominio (Gamblin *et al.*, 2014). Por el contrario, la sobreexpresión de Crb-i o aPKC confiere a la membrana características apicales con el desplazamiento de las proteínas basolaterales (Wodarz *et al.*, 1995; Sotillos *et al.*, 2004). La actividad quinasas de aPKC (ver más adelante) y de Par1, que fosforila a Baz, para impedir la formación del complejo Baz/Par6/aPKC en el dominio basolateral (Benton y St Johnston,

2003) y la asociación de las proteínas fosforiladas con 14.3.3 (Par-5), son esenciales para el mantenimiento de los distintos dominios (Goldstein y Macara, 2007). Por otro lado, la actividad de aPKC está regulada de modo positivo por su unión a las proteínas p32 (Bialucha *et al.*, 2007) y Dap160/ Intersectin (Chabu y Doe, 2008).

14. LA PROTEÍNA QUINASA C ATÍPICA

La serín-treonín quinasa atípica DaPKC (o aPKC) forma parte de la superfamilia de proteínas quinasas C, y está conservada en eucariotas (una isoforma en *S.cerevisiae*, 5 en *Drosophila* y 12 en mamíferos; revisado en Moscat y Diaz-Meco, 2000; Rosse *et al.*, 2010). Se pueden encontrar cuatro subfamilias: Las PKCs convencionales (PKC α , β y γ), las PKCs nuevas (PKC δ , ϵ y θ), las PKC atípicas (PKC ζ y ι/λ) y la subfamilia de PKNs (PKN1,2 y 3).

Todas las isoformas presentan un dominio quinasa en su extremo C-terminal y una secuencia reguladora en su extremo N-terminal. La región reguladora contiene una secuencia pseudosustrato que interacciona con el dominio quinasa bloqueando su actividad. Las PKC atípicas, PKC ζ y PKC ι (o PKC λ en ratón) y su ortólogo DaPKC de *Drosophila*, se diferencian del resto de PKCs por su región reguladora, lo que determina su modo de activación. Así, mientras que las PKCs clásicas y nuevas se activan por uniones a fosfolípidos, diacil-glicerol y ésteres de forbol y son dependientes (directa o indirectamente) de Ca²⁺, la activación de las aPKCs depende de uniones alostéricas a otras proteínas en la membrana. aPKC se encuentra inactiva formando un complejo proteico con Par6 a través de su dominio Phox/Bem 1(PB1) (Moscat *et al.*, 2006). La unión de cdc42-GTP (la forma activa de esta GTPasa) a Par6 a través de su dominio CRIB (por *cdc42/Rac interactive binding domain*) provoca un cambio conformacional de aPKC que libera al dominio quinasa de su inhibición (Moscat y Diaz-Meco, 2000; Rosse *et al.*, 2010).

aPKC presenta múltiples y diversas funciones en el desarrollo relacionadas con la respuesta inmune, procesos inflamatorios, la prevención de la apoptosis, el tráfico intracelular y la polaridad ápico-basal (ver más adelante) y controla la actividad de diversas vías de señalización (revisado en Moscat y Diaz-Meco, 2000; Rosse *et al.*, 2010).

INTRODUCCIÓN

Entre las funciones de aPKC destaca su papel en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad ápico-basal (Izumi *et al.*, 1998; Wodarz *et al.*, 2000; Rolls *et al.*, 2003; Sotillos *et al.*, 2004; Horikoshi *et al.*, 2009) por medio de la fosforilación directa tanto de determinantes apicales como basolaterales. Así, en el epitelio embrionario de *Drosophila*, aPKC activa y mantiene a Crb en el dominio apical (Sotillos *et al.*, 2004) pero excluye a Baz de este dominio (Morais-de-Sa *et al.*, 2010). Inicialmente Baz se une y recluta aPKC/Par6 al dominio apical pero más tarde Crb compete con Baz por unirse al dominio PDZ de Par6, lo que unido a la fosforilación de Baz por aPKC lleva a la disociación del complejo aPKC/Par6/Baz, pasando Baz a formar parte de las uniones adherentes (Morais-de-Sa *et al.*, 2010). Por otro lado, tanto en vertebrados como en invertebrados, aPKC fosforila a Par1 (Hurov *et al.*, 2004; Kusakabe y Nishida, 2004; Suzuki *et al.*, 2004), a Lgl (Betschinger *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2003; Tanentzapf y Tepass, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003) y a Yurt (Gamblin *et al.*, 2014), impidiendo el anclaje de estas proteínas a la membrana apical, confinándolas por tanto al dominio basolateral, lo que es necesario para el establecimiento y separación de dominios.

15. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS: CONTROL DEL TAMAÑO Y DE LA MORFOLOGÍA

Los tejidos epiteliales experimentan un continuo desgaste a lo largo de la vida del organismo. Los animales han desarrollado múltiples y diversos mecanismos homeostáticos para arrostrar el envejecimiento y el desgaste tisular (Rando, 2006). Controlando la producción y liberación de moléculas promotoras del crecimiento y de la proliferación celular, y coordinando estos procesos con la regulación de la muerte celular, se logra el mantenimiento de la morfología, tamaño, arquitectura tisular y función de los diversos tejidos y órganos (homeostasis).

En condiciones fisiológicas, las células senescentes son reemplazadas en un proceso que implica la división celular de otras células progenitoras (Pellettieri y Sanchez Alvarado, 2007). En otras ocasiones, células con diferente actividad metabólica o ritmo de crecimiento que las células vecinas pueden ser eliminadas por éstas por un proceso denominado competición celular (Vincent *et al.*, 2013). La competición celular se basa en el hecho de que los tejidos son microsistemas en los que las células compiten por el espacio y los recursos. Se denominan células “perdedoras” a las que son eliminadas por las células

“ganadoras” o “supercompetidoras” (Abrams, 2002; Moreno y Basler, 2004), que inducen la apoptosis de las células “perdedoras” a través de activación de caspasas (Moreno *et al.*, 2002). Descrita por primera vez en mutantes *Minute* de proteínas ribosómicas de *Drosophila* (Morata y Ripoll, 1975), también se da en mamíferos (Oliver *et al.*, 2004). Actualmente se considera que es un mecanismo de control de la homeostasis tisular, distinguiéndose dos mecanismos de activación: A través de diferencias en el metabolismo (actividad biosintética reducida por alteración de proteínas ribosómicas como en mutantes *Minute* (Morata y Ripoll, 1975), alteración de ritmo de crecimiento como en mutantes *dMyc* (de la Cova *et al.*, 2004; Moreno y Basler, 2004; Claveria *et al.*, 2013), o por alteración de otras vías y reguladores del crecimiento (Tyler y Baker, 2007; Martin *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012)) o por cambios en la arquitectura tisular (alteración en la polaridad celular y estrés mecánico) (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003; Igaki *et al.*, 2006; Igaki *et al.*, 2009; Eisenhoffer *et al.*, 2012; Marinari *et al.*, 2012).

El espacio que dejan las células senescentes al ser eliminadas por apoptosis, o el generado en procesos de competición celular, daño tisular o herida, o en condiciones de alteración en el metabolismo que disminuye el tamaño celular, es ocupado por otras células para mantener el tamaño normal del epitelio. Dependiendo de si el tejido en regeneración tiene capacidad de división o no se pueden distinguir mecanismos basados en la inducción de proliferación o de hipertrofia celular.

Discos imaginales en los que se provoca la apoptosis por irradiación con rayos X o en los que se eliminan inhibidores de apoptosis o se expresan genes pro-apoptóticos (Haynie y Bryant, 1977; Perez-Garijo *et al.*, 2009, revisado en Morata *et al.*, 2011), recuperan su tamaño, con células de tamaño y forma normal, una vez eliminado el estímulo pro-apoptótico. Esta recuperación requiere la activación de la proliferación, y al mecanismo se le conoce como “proliferación compensatoria” (revisado en Mollereau *et al.*, 2013). La regeneración asociada a proliferación compensatoria parece depender de la activación de señales mitógenas enviadas por las células apoptóticas entre las que no se incluyen ni Dpp ni Wg (Perez-Garijo *et al.*, 2009).

Por otro lado, en tejidos que no pueden dividirse (sin células madre o con células post-mitóticas) se ha observado recuperación del tamaño por mecanismos de “hipertrofia celular compensatoria”, que se puede lograr por mecanismos de endorreplicación, activando la vía de la insulina/TOR, o por fusiones de células adyacentes, fenómenos observados tanto en *Drosophila* (en el epitelio folicular) como en mamíferos (hígado o endotelio de la córnea) (revisado en Tamori y Deng, 2014).

I6. ALTERACIONES EN EL DESARROLLO: TUMOROGÉNESIS

La alteración de los mecanismos moleculares que dirigen los procesos biológicos de homeostasis puede llevar a una situación patológica como es el cáncer. Las células tumorales desregulan la proliferación celular mediante distintos procesos tales como un aumento de los ligandos o receptores de las vías de crecimiento, inhibiendo mecanismos de control negativo, evadiendo las respuestas de supresores del crecimiento o evitando la inhibición por contacto dependiente de proteínas de adhesión celular como E-cadherina (Hanahan y Weinberg, 2000).

Los tumores o neoplasias pueden presentar una serie de rasgos característicos: proliferación descontrolada, evasión de supresores del crecimiento, capacidad para la invasión y metástasis, adquisición de inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, resistencia a la muerte celular, inestabilidad genómica, capacidad para evadir la respuesta inmune o la desregulación del metabolismo energético celular (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011). En el caso de los carcinomas o tumores malignos de origen epitelial, que son el tipo de cáncer más abundante del ser humano (85%, de acuerdo con los datos obtenidos de <http://www.cancerresearchuk.org/>), la desorganización de la arquitectura celular es una de sus principales características (Bilder, 2004; Tervonen *et al.*, 2011; Martin-Belmonte y Perez-Moreno, 2012).

La pérdida de adhesión celular es clave en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y contribuye a la invasión y metástasis de las células tumorales (revisado en Lamouille *et al.*, 2014). Células tumorales, al perder las uniones adherentes, modifican su estructura y morfología, pierden su polaridad celular, expresan proteínas de degradación de la matriz extracelular (metaloproteasas), aumentan su motilidad y suelen presentar resistencia a la apoptosis. De este modo, después de separarse de la masa principal del tumor, se extravasan y logran colonizar otras regiones u órganos del mismo individuo (revisado en Lamouille *et al.*, 2014).

I6.1 Tumores en *Drosophila*

En *Drosophila* un tumor se define como una masa de células que prolifera de manera excesiva y descontrolada (Bilder, 2004). Se han observado estos sobrecrecimientos en condiciones mutantes en los epitelios de los discos imaginales, en el epitelio folicular que

rodea a la línea germinal en la cámara del huevo en el ovario de *Drosophila* y en el cerebro larvario (Bilder, 2004; Caussinus y Gonzalez, 2005).

Se considera un gen supresor de tumores (TSG, el acrónimo de sus siglas en inglés *Tumour Suppressor Gene*) a aquél cuya falta de función genera sobrecrecimientos (Hariharan y Bilder, 2006). *Drosophila* presenta genes ortólogos de TSG clásicos de mamíferos como p53 (Lane, 1992) o retinoblastoma (RB) (Burkhart y Sage, 2008), sin embargo las mutaciones de estos genes no generan sobrecrecimientos por sí solas, por lo que a diferencia de mamíferos no son considerados como TSG.

Los TSG de *Drosophila* se subdividen en dos grupos, hiperplásicos y neoplásicos (nTSG). En condiciones mutantes para TSG hiperplásicos el número de células está aumentado pero se mantiene la estructura celular y de los epitelios. Aquí se engloban distintos genes que regulan el crecimiento celular y limitan el tamaño de los órganos como TSC1/2 (*tuberous sclerosis*) (Pan *et al.*, 2004) o PTEN (Goberdhan *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; Palomero *et al.*, 2007) y los genes de la vía de Salvador-Warts-Hippo (SWH) de la que hablaremos a continuación.

Entre los nTSG se encuentran genes que codifican determinantes de polaridad basolaterales como *lgl* (Gateff y Schneiderman, 1967; Gateff y Schneiderman, 1974), *dlg* (Stewart *et al.*, 1972) y *scrib* (Bilder y Perrimon, 2000) y genes que codifican componentes de la vía endocítica: *avalanche*, *rab5*, *Rabenosyn*, *vps25* (*vacuolar protein sorting 25*) o *tsg101* (*tumor susceptibility gene 101*) /*erupted* (Lu y Bilder, 2005; Moberg *et al.*, 2005; Menut *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2008). Los discos imaginales con mutaciones en nTSG aumentan de tamaño, pierden su arquitectura tisular (ya que sus células cambian de morfología y forman multicapas en vez de monocapas), pierden su polaridad (expandiendo su dominio apical), son incapaces de diferenciarse y pueden presentar características de metástasis (Woods *et al.*, 1997; Woodhouse *et al.*, 1998; Lu y Bilder, 2005).

De nuevo, hay que matizar que el término neoplásico en *Drosophila* difiere del empleado en medicina humana, donde neoplasia es un tumor, una masa anormal de tejido que puede ser benigno si su acción es local, o maligno (cáncer) cuando comprime los tejidos próximos y tiene capacidad para invadirlos.

El uso de los discos imaginales como modelos de desarrollo tumoral en *Drosophila* ha ido cobrando importancia en los últimos años (Vidal y Cagan, 2006; Rudrapatna *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓN

Ha servido para el análisis de la función de varias vías de señalización, como son las vías de Notch, PTEN, PI3K, Src, RET y TNF, en el crecimiento tumoral (Read *et al.*, 2005; Ferres-Marco *et al.*, 2006; Palomero *et al.*, 2007; Cordero *et al.*, 2010; Willecke *et al.*, 2011; Enomoto y Igaki, 2013) y para la identificación de nuevos TSG (Bossuyt *et al.*, 2009) y oncogenes (Tukel *et al.*, 2013).

I6.2 La vía de Salvador-Warts-Hippo (SWH)

La vía SWH, que está evolutivamente conservada, controla el crecimiento de los órganos, inhibiendo la proliferación celular y estimulando la apoptosis. En consecuencia, la alteración de esta vía genera crecimientos tumorales hiperplásicos en *Drosophila* y cáncer en humanos (revisado en Oh y Irvine, 2010; Pan, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Staley y Irvine, 2012; Harvey *et al.*, 2013; Johnson y Halder, 2014).

Esta vía podría describirse como un freno a la actividad del oncogén Yorkie (Yki), cuyos ortólogos en mamíferos son YAP y TAZ (Hong y Guan, 2012). Yki es un coactivador transcripcional y por tanto inactivo en el citoplasma. Cuando se transloca al núcleo se asocia a factores de transcripción como Scalloped (Sd, TEAD1-4 en mamíferos) (Goulev *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), Mothers-against-dpp (Mad) (Alarcon *et al.*, 2009; Oh y Irvine, 2011) o al complejo Homothorax-Teashirt (Peng *et al.*, 2009), favoreciendo la transcripción de genes promotores del crecimiento como *Myc* o el microRNA *bantam*, promotores de la progresión de ciclo celular como *E2F1* y *Ciclinas E, A y B* y promotores de supervivencia o inhibición de la apoptosis como *diap1* (*Drosophila inhibitor of apoptosis*, también llamado *thread*). Asimismo, promueve la transcripción de *merlin*, *expanded (ex)*, *kibra* y *four jointed (fj)* en un mecanismo de retroalimentación negativa (Figura I5).

La vía de SWH está altamente regulada a muy diversos niveles. Existe un núcleo de quinasas (Hippo (Hpo) y Warts (Wts) y proteínas asociadas (Salvador (Sav) y Mob-as-Tumor-Suppressor (Mats), que dio nombre a la vía de SWH y que fosforilan y mantiene a Yki inactivo en el citoplasma. Sus ortólogos en mamíferos son respectivamente MST1/2, Lats1/2, Sav1 y Mob1 (Figura I5B). Un complejo proteico formado por la proteína FERM Expanded, el supresor de tumores Merlin (ortólogo de NF2) y Kibra activa la vía de SWH (Baumgartner *et al.*, 2010; Genevet *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012) mientras que el complejo STRIPAK y RASSF la regula negativamente (Polesello *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2010). Por otro lado la actividad de Yki también se encuentra controlada por mecanismos independientes de fosforilación (Badouel *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011).

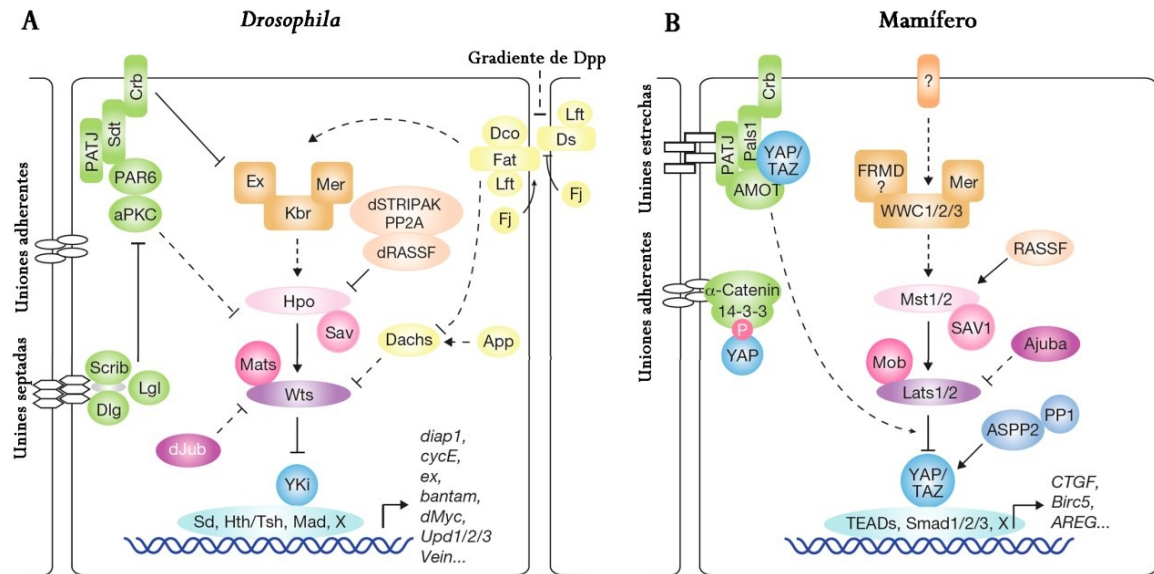


Figura 15. Principales componentes de la vía de SWH en *Drosophila* (A) y mamíferos (B). Las proteínas ortólogas entre especies mantienen el mismo color. Las puntas de flecha o líneas truncadas indican activación o inhibición, respectivamente. Las líneas discontinuas representan mecanismos desconocidos. Adaptado de Zhao *et al.*, 2011).

Además, entre los reguladores de la vía de SWH se encuentran proteínas de polaridad planar (Lawrence y Casal, 2013) y de señalización mediante receptores asociados a proteína G (Yu *et al.*, 2012a; Yu *et al.*, 2012b). La tensión celular (Dupont *et al.*, 2011; Wada *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012) y el citoesqueleto de actina (Fernandez *et al.*, 2011; Sansores-Garcia *et al.*, 2011) también median e integran las señales reguladoras, controlando la activación de la vía (ver figura 15).

La vía de SWH está funcionalmente relacionada con otras vías de señalización algunos de cuyos componentes o reguladores tales como *vein*, *wg*, *unpaired-1* y *dally/dally like* son regulados nivel transcripcional por Yki (Baena-Lopez *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011).

En relación con el tema de esta Tesis hay que señalar que se han encontrado en *Drosophila* numerosos vínculos entre genes de polaridad apicobasal (*crb*, *lgl*, *scrib*, *aPKC*) y la actividad de la vía SWH (revisado en Genevet y Tapon, 2011). Crb participa en la localización de Ex (Chen *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014), mientras que la implicación de Lgl (Menendez *et al.*, 2010) y aPKC pueden deberse a la regulación (en el disco de ojo) de RAASF/Hippo (Grzeschik *et al.*, 2010), aunque con resultados contradictorios (Sun y Irvine, 2011; Parsons *et al.*, 2014), y Scribble lo haría por debajo de Fat (Verghese *et al.*, 2012).

I6.3 Función de los determinantes de polaridad basolaterales como supresores de tumores

Los genes que codifican los determinantes de polaridad basolaterales *lgl* (Gateff y Schneiderman, 1967; Gateff y Schneiderman, 1974) y *dlg* (Stewart *et al.*, 1972) fueron los primeros TSG descritos en *Drosophila*. Posteriormente se identificó también a *scrib* como un TSG (Bilder y Perrimon, 2000).

Los discos imaginales y el epitelio folicular de *Drosophila* homocigóticos mutantes para *lgl*, *dlg*, o *scrib* presentan un tamaño muy superior al normal. Los sobrecrecimientos neoplásicos de estos discos imaginales mutantes no se deben a un aumento de la tasa de proliferación celular (cuantificado en el caso de *lgl* en Menendez *et al.*, 2010 sino a un desajuste en el desarrollo larvario de dichos mutantes, que prolongan *sine die* su estadio de larva (Gateff y Schneiderman, 1974). Así, las larvas mutantes nunca pasan a pupa y terminan muriendo tras varios días extra de crecimiento en estadio de larva con sus discos imaginales convertidos en unas masas informes sobrecrecidas.

Por el contrario, cuando se generan en los discos imaginales grupos de células (clones) mutantes homocigóticas de estos nTSG en un contexto heterocigótico, la supervivencia de las células mutantes es muy baja y no se desarrollan tumores (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003). La muerte de las células mutantes se debe a un proceso de competición celular (ver más arriba) en el que éstas reciben señales proapoptóticas de los tejidos que las rodean. Sin embargo, clones mutantes para nTSG basolaterales adquieren características tumorales (sobrecrecimiento y capacidad invasora) cuando en la misma célula se expresan protooncogenes como la forma activada de Ras (Ras^{V12}) o de Notch (Notch intra) tanto en *Drosophila* (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003) como en mamíferos (Dow *et al.*, 2008). Es interesante recalcar que la supervivencia de los clones *scrib* aumenta incluso cuando se expresa Ras^{V12} en las células vecinas (Wu *et al.*, 2010), una evidencia más de que el microambiente que rodea los tumores es muy importante en el control de la progresión tumoral (Bissell y Hines, 2011).

La falta o deslocalización de las proteínas humanas Dlg1-3, Scribble y Hugl-1 y Hug-2 está relacionada con la generación de varios tipos de tumores (adenocarcinomas serosos de ovario, cáncer de colon, gástrico, esofágico, de mama, próstata y glioblastoma entre otros), revisado en Elsum y Humbert, 2013; Halaoui y McCaffrey, 2014. A nivel molecular se ha descrito que los factores de transcripción que promueven la EMT Snail y ZEB1 son capaces

de reprimir la expresión de *Hugl-1 and Hug-2* (Aigner *et al.*, 2007). También existen mecanismos post-transcripcionales que limitan la actividad de estas proteínas: Oncoproteínas virales como las proteínas E6 y E7 del papilomavirus humano, causantes del 90% de cáncer de cuello uterino envían a degradación a los determinantes basolaterales (revisado en Humbert *et al.*, 2008).

I6.4 Función de los determinantes de polaridad apicales en la tumorigénesis

Mutaciones homocigóticas en los genes *baz*, *cdc42* o *sdt* en los discos imaginales no generan sobrecrecimientos por sí solas pero sin embargo presentan sobrecrecimientos metastáticos al combinarlos con la forma activada de Ras, Ras^{V12} (Pagliarini y Xu, 2003) por lo que se pueden considerar TSG. *Crb3* es también un TSG ya que su expresión está reducida en tumores en humanos, por acción de factores de transcripción que inducen EMT (revisado en Laprise y Tepass, 2011).

Sin embargo, no todos los genes implicados en la polaridad apicobasal actúan como TSG. Existen numerosas evidencias que indican que PKC ϵ se comporta como un oncogén en humanos. Los niveles de PKC ϵ aparecen elevados o la proteína está deslocalizada en distintos tipos de carcinomas tales como carcinoma serosos de ovario, pulmón, pecho, colon, cuello, cabeza, e hígado (revisado en Fields y Regala, 2007; Aranda *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2011). De hecho, altos niveles de PKC ϵ indican un pronóstico grave para varios tipos de cáncer (Regala *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2011).

El aumento en la cantidad de aPKC se debe bien a la amplificación de la región cromosómica que incluye *PRKCI*, el gen que codifica PKC ϵ (3q26.2, uno de los amplicones más frecuentes en cáncer en humanos, Murray *et al.*, 2011) o a la activación directa de la transcripción de este gen por Bcr-Abl a través de la vía de MAPK (Gustafson *et al.*, 2004).

PKC interviene en el control de la proliferación de las células tumorales y en su diseminación como se ha demostrado mediante experimentos donde al limitar la actividad de PKC ϵ se bloquean los sobrecrecimientos tumorales y la metástasis (Stallings-Mann *et al.*, 2006). Por tanto PKC ϵ está implicada en la iniciación y en la progresión tumoral, revisado en Fields y Regala, 2007; Aranda *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2011 y se han desarrollado ya algunas terapias antitumorales basadas en la inhibición de la actividad de la vía de señalización de aPKC (Parker *et al.*, 2014).

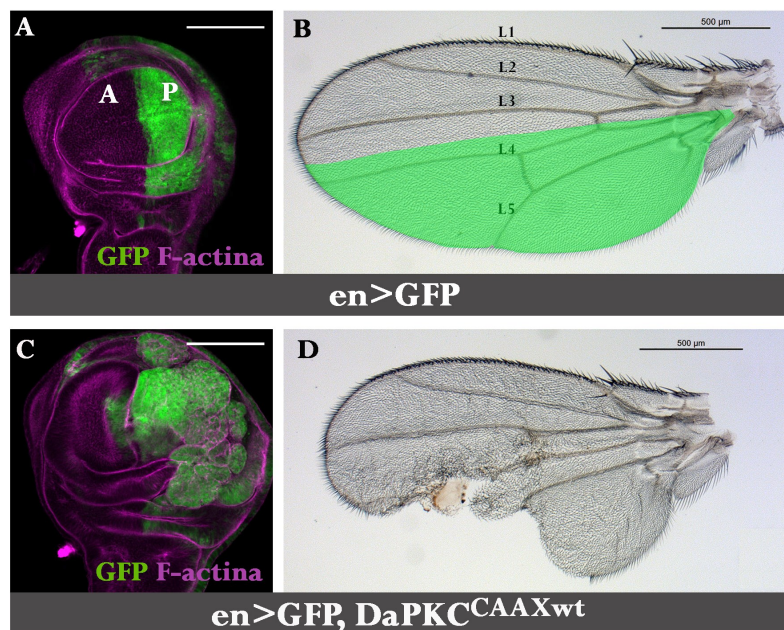


Figura I6. La expresión de DaPKC^{CAAXwt} provoca el sobrecrecimiento del disco de ala y causa malformaciones en las alas adultas. (A, C) Expresión ectópica de la proteína GFP (A, control) y coexpresión de GFP y DaPKC^{CAAXwt} (C) en el compartimento posterior de discos de ala controlada por la línea *en*-Gal4. En verde, expresión de GFP; en magenta tinción, con faloidina que revela la F-Actina. A y C son secciones ópticas tangenciales a la superficie apical del disco. En ésta y en figuras sucesivas de discos imaginales el compartimento P se muestra a la derecha de las imágenes. (B, D) Alas de machos de los genotipos indicados. Se señala la posición de las venas L1 a L5. La extensión del compartimento posterior está marcada en verde sobre el ala control en B. Para simplificar, en la figuras el símbolo “>” representa Gal4/UAS. Barras de calibrado de 100 μ m (A, C) y 500 μ m (B, D).

Estudios realizados en *D. melanogaster* sugieren que DaPKC también se comporta como un oncogén en este organismo. Para ello se han utilizado tres tipos de herramientas. En nuestro laboratorio generamos la línea de moscas *UAS-DaPKC^{CAAXwt}* que expresa una variante de DaPKC dirigida a la membrana por contener la secuencia de prenilación CAAX (en concreto, Cys-Val-Leu-Ser) y que por ello es constitutivamente activa (Sotillos *et al.*, 2004) (ver la Figura R2). Betschinger *et al.*, (2003) generaron la línea de moscas *UAS-DaPKC^{Delta}* que expresa aPKC de *Drosophila* truncada en el dominio N terminal, y por tanto activa ya que carece del dominio inhibidor pseudosustrato, pero que es predominantemente citoplasmática. Eder *et al.*, 2005, generaron una estirpe que expresa una variante de aPKC ζ de ratón con una delección de 5 amino ácidos en el dominio del pseudosustrato. La sobreexpresión de estas formas constitutivamente activas de aPKC en los discos imaginales de ojo y ala ocasiona su sobrecrecimiento y altera el desarrollo de las estructuras adultas (Figura I6 y Sotillos *et al.*, 2004; Eder *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Grifoni *et al.*, 2007; Leong *et al.*, 2009; Grzeschik *et al.*, 2010).

Grifoni *et al.*, (2007) atribuyen el sobrecrecimiento del disco de ala asociado a la expresión de *UAS-DaPKC^{CAAX^{wt}}* a la deslocalización de Lgl de la membrana plasmática mientras que Grzeschik *et al.*, (2010) sugieren que se debe a la inactivación de la vía de SWH. Para profundizar en el mecanismo molecular de actuación de aPKC en condiciones normales y aproximarnos al estudio del efecto de su desregulación en procesos tumorales, en esta Tesis se ha realizado el estudio de la actividad de la proteína quinasa DaPKC como regulador de la proliferación celular y de la arquitectura tisular con los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

- Análisis de los fenotipos mutantes asociados a la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de DaPKC (aPKC-CA) en los epitelios de *Drosophila*.
- Estudio del efecto de aPKC en la proliferación celular.
- Caracterización de los sobrecrecimientos de los discos imaginales asociados a la sobreexpresión de aPKC-CA. ¿Pueden ser considerados crecimientos tumorales? ¿De qué tipo, hiperplásicos o neoplásicos?
- Búsqueda del mecanismo molecular, vías de señalización y genes implicados en el desarrollo de los sobrecrecimientos.
- Análisis fenotípico de la falta de función de aPKC en el disco imaginal de ala.

MATERIALES Y MÉTODOS

M1. ANÁLISIS GENÉTICO

M1.1 Cepas de *Drosophila*

Líneas Gal4

en-Gal4 (Brand y Perrimon, 1993) y *hh*-Gal4 (Tanimoto *et al.*, 2000) dirigen la expresión génica en el compartimento posterior de los discos imaginales, *dpp*-Gal4 se expresa en una franja de células del compartimento anterior en contacto con la frontera antero-posterior (A/P) (Morimura *et al.*, 1996), *sal*^{EPV}-Gal4 se expresa en el centro de la región presuntiva de ala (Cruz *et al.*, 2009), *dachsous*-Gal4 (*ds*-Gal4 o 30A-Gal4) se expresa en axila y pleura en larva de tercer estadio (Matakatsu y Blair, 2006), *pannier*-Gal4 (*pnr*^{MD237}) y *nubbin*-Gal4 (*nub*-Gal4, (Calleja *et al.*, 1996) lo hacen en la región de notum proximal y en la región del ala respectivamente y *eyeless*-Gal4 (*ey*-Gal4 (Hazelett *et al.*, 1998) se expresa en el disco de ojo-antena anterior al surco morfogenético. Los dominios de expresión en el disco de ala de las diferentes líneas Gal4 empleadas se esquematizan en la figura M1.

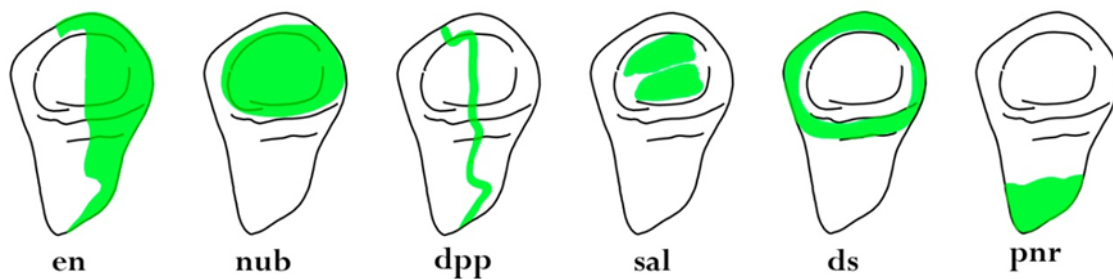


Figura M1. Esquemas de discos imaginales de ala en el tercer estadio larvario. En verde se indican los dominios de expresión de las líneas Gal4 empleadas.

Líneas UAS

UAS-DaPKC^{WT} (en adelante denominado *UAS-aPKC*), *UAS-DaPKC*^{CAAX-WT} (que expresa una forma constitutivamente activa (CA) de DaPKC, en adelante, *UAS-aPKC-CA*) y *UAS-DaPKC*^{CAAX-DN} (una isoforma dirigida a la membrana pero mutada en el dominio de unión a ATP (K293W) y por tanto inactiva para la función quinasa, que se comporta como un dominante negativo (DN), en adelante, *UAS-aPKC-DN*) (Sotillos *et al.*, 2004), *UAS-yorkie* (*UAS-yki*, (Huang *et al.*, 2005), cedido por K. Irvine, *UAS-capping protein a* (*UAS-HA-cpa*,

MATERIALES Y MÉTODOS

Janody y Treisman, 2006, cedido por F. Janody), *UAS-hippo* (*UAS-hpoM11.1*, Pantalacci *et al.*, 2003), *UAS-diminished* (*UAS-dm*, que codifica dMyc, Zaffran *et al.*, 1998), *UAS-p35* (Hay *et al.*, 1994), *UAS-lethal giant larvae* (*UAS-lgl*) y *UAS-lgl^{3A}*, que expresa una forma de Lgl no fosforilable por aPKC, (Betschinger *et al.*, 2003), regalo de J. Knoblich, *UAS-dacapo* (*UAS-dap* (p21)) (de Nooij *et al.*, 1996), *UAS-lacZ*, *UAS-GFP*, *UAS-cytGFP* y *UAS-flp* se obtuvieron del Bloomington *Drosophila* Stock Center).

Líneas UAS- RNAi

UAS-RNAi DaPKC (S. Sotillos, datos no publicados), *UAS-RNAi basket* (Bloomington #32977).

Líneas con inserciones indicadoras

Para analizar la transcripción de *Diap1*, *ex* y *puckered* (*puc*) se emplearon las líneas *Diap1-lacZ* (Hay *et al.*, 1995), *ex-lacZ* (Boedigheimer y Laughon, 1993) y *puc-lacZ* (*puc^{e69}* (Ring y Martínez Arias, 1993) en las que el gen bacteriano *LacZ* se encuentra insertado en el locus del gen de interés y se expresa bajo el control de sus secuencias reguladoras. También se empleó *E(spl)mβ-CD2*, inserción marcadora de la actividad transcripcional de la vía de Notch, que expresa *CD2* bajo el control de los sitios de unión de Suppressor of Hairless (*Su(H)*) presentes en el gen *E(spl)mβ* (de Celis *et al.*, 1998).

Otros

(1) La cepa Silvestre Oregon R se empleó como control; (2) *y w ey-FLP* (Bloomington #5580); (3) *FRT42D GMR-hid l(2)CL-R[1]/ CyO; ey-Gal4 UAS-FLP*. (Bloomington #5251); (4) *w; l(2) T S91¹ sna^{sc0} /CyO tub-Gal80* (Bloomington #9491); (5) *tub-Gal80^{ts}* (Bloomington #7017); (6) *FRTG13 Ubi-GFP*; (7) *FRTG13 M(2) 58F/CyO* (8) *y w; FRTG13, πMyc tub-Gal80/ CyO; tub-Gal4/ TM2* (Bloomington #5143); (9) *Act FRT yellow FRT Gal4 UAS-GFP* (Ito *et al.*, 1997), cedido por A. Baonza; (10,11) *DaPKC^{K06403}* y *FRTG13 DaPKC^{K06403}* (Wodarz *et al.*, 2000); (12) *FRT42D DaPKC^{K06403}* (generada por S. Campuzano), (13) *yki^{MB09079}* (Bloomington #26142).

M1.2 Métodos

M1.2.1 Cultivo de *Drosophila*

Las estirpes de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron en medio de cultivo estándar y a condiciones de temperatura comprendidas entre 18 y 25°C.

M1.2.2 Sobreexpresión y expresión ectópica controlada mediante los métodos Gal4/UAS y Gal4/Gal80/UAS

La proteína Gal4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un activador de la transcripción que reconoce y se une directamente a las secuencias reguladoras UAS (de sus siglas en inglés *Gal4 responsive Upstream Activating Sequences*). Se observó que este sistema también actuaba como regulador génico en organismos eucariotas multicelulares como *Drosophila* (Fischer *et al.*, 1988) o en cultivos de células humanos (Webster *et al.*, 1988) de forma que Gal4 activa la transcripción de cualquier gen que contenga secuencias UAS en su región reguladora. La técnica Gal4/UAS desarrollada por Brand y Perrimon (1993) permite controlar la expresión, en el espacio y en el tiempo, de un gen de interés si su secuencia codificante está precedida por los sitios UAS. Brand y Perrimon (1993) y otros autores han generado una batería de stocks que expresan el gen *gal4* bajo el control de diversos elementos reguladores de la expresión génica de *Drosophila* (ver, por ejemplo, la Figura M1). Por cruce entre una línea Gal4 determinada y otra que lleve el gen en estudio bajo el control de las secuencias UAS se logra la activación de dicho gen en el dominio de expresión de Gal4 (Brand y Perrimon, 1993) (Figura M2). La expresión de RNAs de doble cadena (Nagel *et al.*, 2002) bajo el control de las secuencias UAS permite el silenciamiento de genes (Lee y Carthew, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

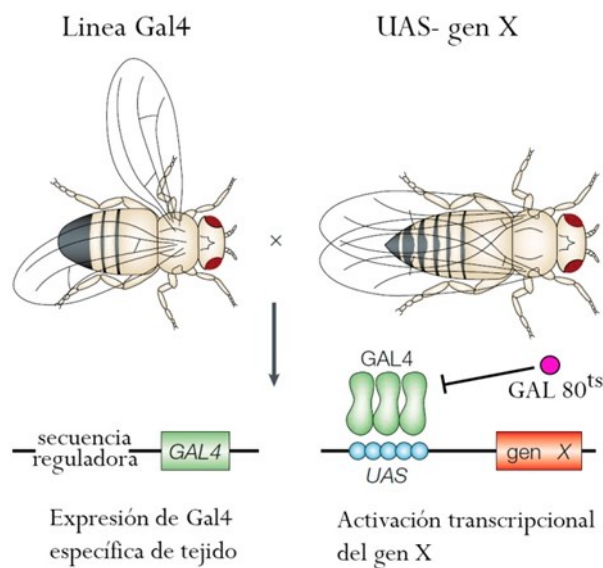


Figura M2. La técnica binaria UAS/Gal4 permite la transcripción de un gen UAS-X en las células que expresen la proteína Gal4. La proteína Gal80^{ts} se une a Gal4 bloqueando su acción dependiendo de la temperatura (Modificado de Brand y Perrimon, 1993).

La actividad de la proteína Gal4 es sensible a la temperatura, siendo mucho más eficiente a 25 °C o 29 °C que a 17°C lo que permite modular la activación del gen UAS-X cambiando la temperatura de cultivo. Por ello, la progenie de los cruces para la sobreexpresión de *UAS-DaPKC^{CAAX-wt}* dirigida por *en-Gal4* se mantuvo a 17 °C hasta que los animales alcanzaron el estadio de larva II para evitar letalidad temprana asociada a la sobreexpresión de *UAS-DaPKC^{CAAX-wt}*, pasándolos a 25 °C hasta su disección en fase de larva III trepadora 48-72 h después (Figura M4). Salvo que se indique lo contrario, los experimentos de expresión con el sistema UAS/GAL4 mostrados en esta Tesis se llevaron a cabo en estas condiciones.

Al sistema Gal4/UAS se le añadió un mecanismo de control adicional basado en la actividad de la proteína Gal80, que inhibe la capacidad de activar la transcripción de Gal4 mediante unión directa proteína-proteína (Nogi *et al.*, 1984; Ma y Ptashne, 1987; Lee y Luo, 1999). Como en presencia de Gal80, Gal4 es inefectiva, hemos utilizado esta estrategia para mantener la combinación inviable *en-Gal4; UAS-DaPKC^{CAAX-wt}* en forma de la estirpe *en-Gal4/CyO tub-Gal80; UAS-DaPKC^{CAAX-wt}*. El transgén *tub-Gal80* expresa de manera constitutiva Gal80 bajo el control del promotor ubicuo de un gen de tubulina.

Para expresar $DaPKC^{CAAx}$ en el disco de ojo a lo largo de todo su desarrollo y en todas sus células generamos la línea de moscas $y w ey-FLP$, $Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP/CyO tub-Gal80$, $UAS-DaPKC^{CAAx-wt}/TM6b (Tb)$. Al eliminar mediante un cruce el cromosoma balanceador $CyO tub-Gal80$, se obtienen individuos $y w ey-FLP$, $Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP /+; UAS-DaPKC^{CAAx-wt}$ (clase experimental) y $y w ey-FLP$, $Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP /+; TM6b Tb/+$ (clase control, marcados por la mutación Tb) que expresan $DaPKC^{CAAxwt}$ y GFP (experimento) o sólo GFP (control) en el disco de ojo de manera constante y en todas sus células (Figura Suplementaria S2).

Existe una forma de Gal80 sensible a temperatura ($Gal80^{ts}$ (McGuire *et al.*, 2003)) que se inactiva a temperaturas superiores a 29°C. La utilización de $Gal80^{ts}$ permite un control temporal de la actividad de Gal4. Por ejemplo, si larvas del genotipo $X-gal4/ UAS-DaPKC^{CAAx-wt}; tub-Gal80^{ts}$ se mantienen a 17°C; $UAS-DaPKC^{CAAx-wt}$ no se expresa porque $Gal80^{ts}$ está activa y Gal4 inactiva. Cambiando la temperatura de cultivo a 29°C se logra la expresión de $UAS-DaPKC^{CAAx-wt}$ al inactivarse $Gal80^{ts}$ y aumentar la actividad de Gal4.

M1.2.3 Técnicas de análisis clonal

En ocasiones la falta de función de un gen o su sobreexpresión ubicua es letal para el organismo. Por ello, para analizar la función génica se desarrollaron las técnicas de análisis clonal que permiten la obtención de grupos de células mutantes descendientes de un precursor común (clones) en un fondo (o entorno) control.

M1.2.3.1 Generación de clones de falta de función por recombinación mitótica

Para la inducción de clones de falta de función se empleó el sistema FRT/FLP (Golic y Lindquist, 1989; Xu y Rubin, 1993), consistente en activar la recombinación mitótica entre cromátidas de cromosomas homólogos a través de secuencias de reconocimiento de flipasa (secuencias FRT) presentes en los cromosomas en estudio y mediada por la enzima recombinasa flipasa (FLP) de levadura. Las secuencias reguladoras del gen *flp* han sido sustituidas por el promotor termosensible del gen *hsp70* de *Drosophila* (Lis *et al.*, 1983;

MATERIALES Y MÉTODOS

Golic y Lindquist, 1989). De este modo tras choque térmico (*hs*, acrónimo de sus siglas en inglés *heat shock*), la flipasa se expresa y cataliza la reacción de recombinación de las secuencias FRT. Tras la mitosis, en algunos casos se generan células homocigóticas para la mutación en estudio y este genotipo se mantiene en su descendencia (Figura M3).

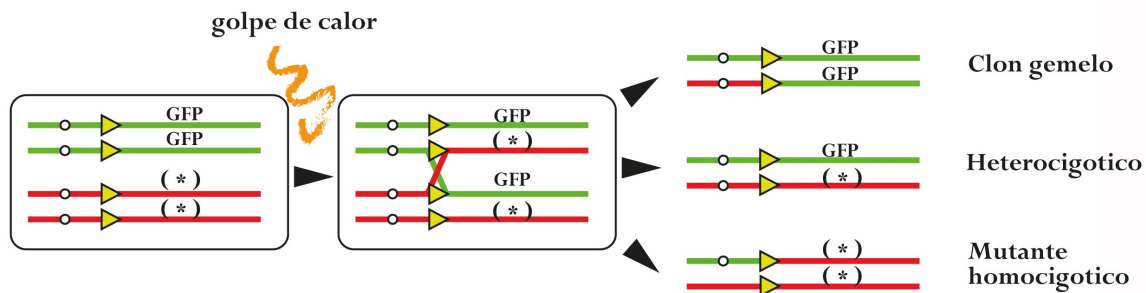


Figura M3. Intercambio de material genético mediado por la recombinasa FLP. La célula de la izquierda presenta un cromosoma con un transgén que expresa GFP de forma ubicua (*ubi-GFP*) mientras que el cromosoma homólogo lleva la mutación que se quiere estudiar. Ambos cromosomas contienen la misma secuencia FRT. Esta célula porta también el gen *hs-flp*. Un choque térmico activa la transcripción de *hs-flp* y la recombinasa FLP media la recombinación cromosómica a través de las secuencias FRT. Al segregarse los cromosomas en la mitosis, si no ha habido recombinación (o se ha producido entre cromátidas hermanas) se generarán dos células heterocigóticas iguales a la original. Por el contrario, la recombinación entre cromátidas de cromosomas homólogos dará lugar a una célula que porta dos dosis de *ubi-GFP* y una célula hermana mutante homocigótica marcada por falta de GFP.

El protocolo para la generación de clones de falta de función consistió en el cruce de las líneas parentales *y w hs-flp; FRTG13 DaPKC^{K06403} / CyO* con *y w hs-flp; FRTG13 ubi-GFP* o con *w; FRTG13 π Myc tub-Gal80 / CyO*; MKRS/TM6b. Los huevos depositados en puestas de 24h se dejaron envejecer de 24 a 72 h a 25 °C, para posteriormente recibir un choque térmico de 1h a 37 °C. Se mantuvieron las larvas a 25 °C hasta su disección (72-120 h tras el choque térmico) (Figura M4).

Para la obtención de discos imaginales de ojo en los que la mayoría de las células eran mutantes nulas para *aPKC* los parentales fueron *FRT42D GMR-hid l(2)CL-R^l / CyO*; *ey-Gal4 UAS-FLP* y *FRT42D DaPKC^{K06403} / CyO*. *ey-Gal4* induce la expresión de FLP, y por tanto la generación de clones, en todo el territorio del disco de ojo y la presencia de *GMR-hid l(2)CL-R^l* elimina los clones gemelos.

M1.2.3.2 Generación de clones Minute

Con el objetivo de conferir una ventaja competitiva a los clones de falta de función de *DaPKC* se empleó también la técnica de generación de clones en fondo Minute (Morata y Ripoll, 1975). En este caso las líneas parentales del cruce fueron *y w hs-flp*; FRTG13 *DaPKC^{K06403}* /CyO y *w*; FRTG13 *M(2) 58F* /CyO. Los clones mutantes están marcados por la falta de expresión de *DaPKC*.

M1.2.3.3 Generación de clones MARCM

Se empleó asimismo la técnica de generación de clones MARCM (de sus siglas en inglés *Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker*) (Lee y Luo, 2001), que combina las técnicas GAL4/UAS y FLP/FRT para generar clones mutantes para *DaPKC* en los que se sobreexpresa otro gen, en nuestro caso *Diap1* o *dMyc*. Los parentales empleados fueron *w*, FRTG13 π Myc *tub-Gal80*/ CyO; *tub-Gal4*/ TM6b y *y w hs-Flp*; FRTG13 *DaPKC^{K06403}* /CyO; *UAS-Diap1* (o *UAS-dMyc*) /TM6b. Las larvas recibieron un choque térmico de 1 h a 37 °C a las 48-72 h tras la puesta. Los clones *DaPKC* están marcados negativamente por falta de expresión de Myc o de *DaPKC*.

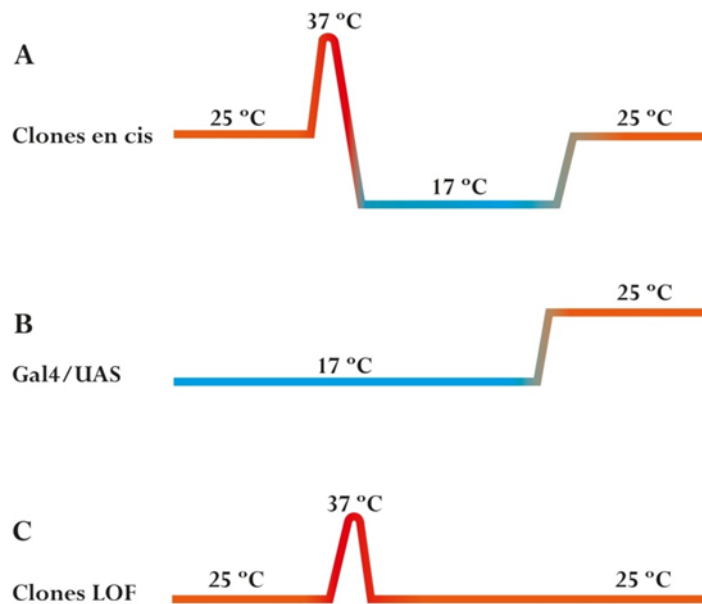


Figura M4. Esquema de los experimentos genéticos. (A) Para la generación de clones de sobreexpresión de *UAS-DaPKC^{CAAX}* o de *UAS-RNAi DaPKC* se mantuvieron las larvas a 25 °C de 48 a 72 horas, se les sometió a un choque térmico a 37 °C de duración variable, y se mantuvieron a 17 °C durante 1 o 2 días pasándose a 25 o 29 °C hasta su disección. (B) Los cruces de sobreexpresión empleando el método Gal4/UAS se mantuvieron a 17 °C hasta que los animales alcanzaron el estadio de

larva II, pasándolos a continuación a 25 °C hasta su disección. (C) Para la generación de clones de falta de función de *aPKC* (clones *DaPKC^{K06403}*) se sometió a las larvas a un choque térmico 60 min a 37 °C a las 24-72 horas tras la puesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

M1.2.3.4 Generación de clones de ganancia de función (clones en cis o clones *flp-out*)

Este método fue desarrollado por Ito *et al.*, 1997 combinando el sistema FLP/FRT con el sistema Gal4/UAS. La línea parental *Act FRT yellow FRT Gal4* lleva un transgén donde el promotor constitutivo del gen *Actin5C* está separado del gen *gal4* por un fragmento de DNA que contiene el gen *yellow* flanqueado por dos secuencias FRT situadas en *cis*, y denominado casete *flp-out* (Struhl y Basler, 1993) (Figura M5). Este casete contiene también señales de parada de la transcripción, de modo que la transcripción de Gal4 no ocurre hasta que en presencia de FLP (generada por la activación tras un choque térmico del transgén *hs-Flp*), las secuencias FRT se alinean, y el casete *flp-out* se escinde por recombinación. De este modo, la proteína Gal4 se expresa exclusivamente en aquellas células que han recombinado y en su progenie.

Empleamos este sistema para la generación de clones de células que expresan *UAS-DaPKC^{CAAX WT}* o *UAS-RNAi DaPKC* realizando los siguientes cruces:

Act FRT yellow FRT Gal4 UAS-GFP; tub Gal80^{TS} x *y w hs-FLP; UAS-DaPKC^{CAAX-wt}*

Act FRT yellow FRT Gal4 UAS-GFP x *y w hs-FLP; UAS-RNAi DaPKC*

Tras la puesta de huevos durante 24 h, se dejaron envejecer de 24 a 72 h a 25 °C. Se sometieron las larvas a un choque térmico durante 8, 10, 15 o 60 min a 37°C y se mantuvieron a 17°C (temperatura a la que Gal4 activa de modo muy poco eficiente la transcripción) durante 1 o 2 días para permitir el crecimiento de los clones en condiciones silvestres. A continuación se pasaron las larvas a 25°C o 29°C de modo que Gal4 activa la expresión de los genes con secuencias UAS. Se mantuvieron a esta temperatura hasta su disección al alcanzar el estadio de larva III tardía (larva trepadora) (72-120 h tras el choque térmico) (Figura M4). Los clones de células que expresan los diferentes transgenes se reconocen en los discos imaginales por la expresión de GFP.

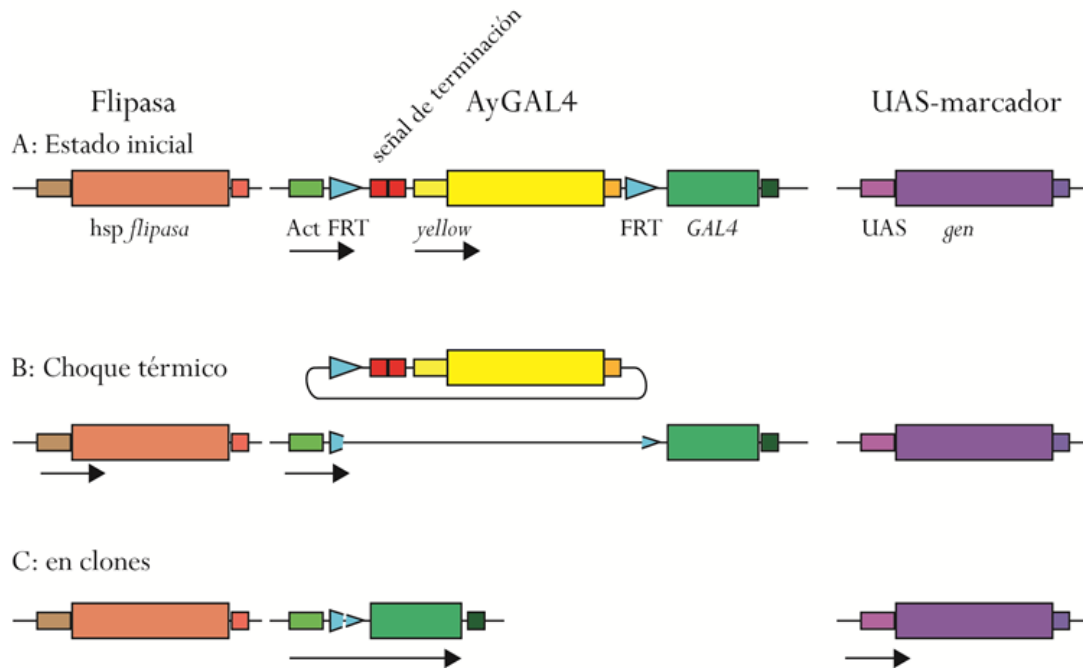


Figura M5. Esquema del sistema de obtención de clones en *cis*. (A) Estado inicial, la proteína Gal4 no puede generarse debido a las señales de terminación de la transcripción presentes al inicio del casete FRT-*yellow*-FRT. (B) El choque térmico induce la recombinación en *cis* de las secuencias FRT y la escisión del casete FRT-*yellow*-FRT. El gen *gal4* queda entonces bajo el control del promotor del gen *Act5C* y se expresa de forma ubicua en la células donde se ha producido la escisión del casete y en toda su progenie (clones en *cis*) (C). En estas células también se expresa cualquier gen que contenga secuencias UAS en su zona reguladora. Modificado de Ito *et al.*, 1997.

M2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR

M2.1 Inmunohistoquímica.

Las técnicas de marcaje de tejidos con anticuerpos permiten detectar la presencia e incluso la localización subcelular de proteínas, y el análisis de la expresión génica. Durante el desarrollo de esta Tesis se utilizaron los siguientes métodos:

M2.1.1 Inmunofluorescencia.

A temperatura ambiente (TA) se diseccionaron las larvas de tercer estadio en tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*), extrayendo y fijando los discos imaginales en solución de fijación PBF (PBS + paraformaldehído al 4%) durante 20 min, seguido de 3

MATERIALES Y MÉTODOS

lavados en PBT (PBS + 0,3% del detergente Tritón X100) de 10 min cada uno y 3 incubaciones de 20 min en el tampón de bloqueo PBT-BSA (PBS, 0,3% TritónX100, 1% seroalbúmina bovina). Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS (ver el listado de anticuerpos y diluciones en el Anexo 1), a 4 °C en agitación durante toda la noche en tubo de microcentrífuga tipo *ependorf*. Se volvieron a lavar los discos en PBT (3 x 15 min) a TA y se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 h (diluido 1/200 en PBT-BSA). Se lavaron de nuevo en PBT y se almacenaron en PBS hasta su preparación en el medio de montaje en Vectashield (Vector) o en DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech) que permite la visualización de los núcleos celulares.

Para visualizar la actina cortical, en algunos casos se añadió faloidina (faloidina TRITC o faloidina Alexa-Fluor 647) a la concentración de 1:200 al medio de incubación con el anticuerpo secundario.

M2.1.2 Marcaje de núcleos con ioduro de propidio

Para la tinción nuclear con ioduro de propidio (PI) se realizó una fijación, lavados y bloqueo similar al apartado anterior, seguido de una incubación en PBS + RNAsa 400 ng/μl a 37 °C durante 1 h; se lavó en PBS y se incubó durante 20 min a TA en PI a concentración final de 5 μg/ml, se volvió a lavar en PBS y se volvió a bloquear durante 45 min en PBT-BSA.

M2.1.3 Análisis de la proliferación celular

Para la detección de células en mitosis (M) se utilizó la tinción con el anticuerpo anti-Histona H3 fosforilada (Goto *et al.*, 1999) (Anexo 1) llevada a cabo como se indicó más arriba en el apartado de Inmunofluorescencia, M2.1.1. Para la detección de ADN en fase replicativa se analizó la incorporación del análogo de timidina EdU (Salic y Mitchison, 2008) utilizando el kit Click-iT EdU HCS Assays (Invitrogen). Este método se combinó con la tinción con anticuerpos específicos del siguiente modo:

Se disecaron larvas en medio Insect-XPress (MI) (Lonza) mezclado en proporción 1:1 con PBS. Posteriormente, se incubaron en solución 1 mM de EdU en MI/PBS (1:1) durante 15-30 min con agitación a 25 °C. Se fijó el tejido en PBF durante 1 h. Se lavó tres veces en PBT durante 20 min y se permeabilizó con tres incubaciones de 20 min en PBS+ 0,1% TritonX100 + BSA 3% (PBT-BSA 3%). Se incubó con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C en PBT-BSA al 3%. A continuación se realizaron 3 lavados de 20 min en PBT y tres lavados de 20 min en PBT-BSA 3% antes de incubar con el anticuerpo secundario en PBT-BSA 3% durante 48 h a 4 °C. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 20 min en PBT y tres de 20 min en PBT-BSA 3% antes de incubar en oscuridad durante 30 min en *Click-iT reaction buffer* (preparado *ad hoc* según el protocolo comercial). Finalmente, se realizaron 3 lavados de 20 min en PBT y se montaron los discos en Vectashield (Vector).

Para el cálculo del índice mitótico se determinó el valor medio del número de células en mitosis de la región en estudio, detectadas por la expresión de Fosfo-Histona 3, dividido por el tamaño del área en $\mu\text{m}^2 \times 10^3$. El índice mitótico relativo P/A corresponde al cociente entre los índices mitóticos de los compartimentos Posterior y Anterior. Las imágenes utilizadas para realizar este análisis fueron las proyecciones de al menos 15 planos focales de un mismo disco.

M2.1.4 Análisis de apoptosis

Las células en apoptosis se detectaron mediante tinción con anticuerpo anti-Caspasa 3 activada (Anexo 1) empleando la técnica de inmunofluorescencia (Métodos M2.1.1) o con la tinción TUNEL (de las siglas en inglés de “Marcaje de roturas terminales con dUTP por deoxynucleotidil transferasa terminal”, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). La disección y fijación de los discos imaginales se realizó de modo similar a lo mencionado en inmunofluorescencia (Métodos M2.1.1). Tras los lavados con PBT se incubaron los discos en 30 μl de mezcla de reacción (0,5U/ μl de deoxynucleotidil transferasa terminal (TdT), 6,6 μM Bio-14 dATP, 0,3% Triton X100, 125 mM de cacodilato sódico, 0,25 mM β -mercaptoetanol y 2,5 mM CoCl_2) en tubos *ependorf* durante 3 h a 37 °C. A continuación se transfirieron los discos imaginales a cestillos, se realizaron 2

MATERIALES Y MÉTODOS

lavados de 30 min en PBT y se detectó la incorporación de Bio-14 dATP mediante incubación con el KIT ABC elite (Vector) siguiendo las instrucciones del proveedor y revelado con diaminobencidina (DAB) 0,5 mg/ml a la que se le añadió H₂O₂ al 3%. Se detuvo la reacción con PBT, se deshidrató y se montó la muestra en Bálsamo de Canadá (Serva).

M2.1.5 Hibridación *in situ*

Para analizar niveles transcripcionales de las inserciones *Diap1-lac-Z* y *ex-lacZ* se procedió al análisis, mediante hibridación *in situ*, de la transcripción del gen *lacZ* utilizando como sonda RNA marcado con digoxigenina complementario al mRNA de *lacZ* (generada en el laboratorio por Esther González utilizando el Dig RNA labelling kit de Roche). Para ello se diseccionan los discos imaginales de larvas de tercer estadio y se fijaron mediante incubación en PFA (durante 20 min) seguido de incubación en PFA + Tritón X100 0,1% durante 20 min. Después de dos lavados de 5 min con PBS se deshidrataron los discos mediante incubaciones sucesivas de 5 min en etanol al 30%, 50%, 70%, 96% y finalmente en etanol absoluto (en este punto se pueden almacenar los discos a -20°C). A continuación se lavaron con etanol absoluto : xileno (1:1) y se incubaron en xileno durante 3 h. Transcurrido ese tiempo se lavaron con etanol absoluto:xileno (1:1), con etanol absoluto y finalmente con metanol, repitiendo éste último lavado 5 veces. En este punto se guardaron los discos a -20°C un mínimo de dos días.

Para rehidratar los discos se lavaron con metanol: PBTw (PBS con 1% DEPC + 0,1% Tween20) 1:1 y se incubaron durante 5 min en PBTw. Finalmente se volvieron a fijar durante 20 min a temperatura ambiente con PFA y se lavaron con PBTw, durante 5 min 4-5 veces.

A continuación se incubaron los discos durante 10 min a TA en 500ml de solución de hibridación (SH): 500 ml de PBT. Después se incubaron 10 min a 55°C sólo con SH y se prehibridaron en SH a 55°C durante 1 h (sin agitación). Para la hibridación se añadió la sonda de ARN, previamente diluida 1:100 en SH y desnaturalizada por incubación de 5 min a 80°C. La hibridación se llevó a cabo durante toda noche a 55°C.

Para la detección se transfirieron los discos a cestillos y se lavaron a 60°C durante 20 min con: SH (dos veces); SH al 80% (SH: PBTw, 4:1), 60% (3:2), 40% (2:3), 20% (1:4) y finalmente, dos veces sólo con PBTw a TA. A continuación se incubaron 2 h a TA con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche, diluido 1:2000) y se lavaron 4 veces durante 20 min con PBTw y 3 veces durante 5 min con buffer 3 (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris HCl pH 9,5, 0,1% Tween20). Para revelar la actividad de la fosfatasa alcalina se añadieron al último lavado 9 µl de NBT y 7 µl de BCIP (Roche), y se visualizó la aparición de la tinción en la lupa. Para parar la reacción se lavó 2 veces durante 5 min con PBTw y después se deshidratan los discos por incubaciones sucesivas de 5 min en etanol al 30%, 50%, 70%, 96% y etanol absoluto, donde se dejaron a -20°C hasta su montaje en Bálsamo de Canadá (Serva).

M2.2 Montaje de estructuras adultas

Se utilizó el medio de montaje Ácido Láctico / Etanol (6:5) para las preparaciones de alas adultas (realizadas por Rosario Hernández).

M2.3 Obtención de perfiles de ciclo celular

Se llevó a cabo por medio de *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) siguiendo el protocolo descrito en Neufeld *et al.*, 1998. Comparamos los patrones de ciclo celular de células aisladas de discos imaginales de los genotipos *en-Gal4 UAS-GFP* y *en-Gal4 UAS-GFP UAS-aPKC^{CAAX-WT}* teñidas con Hoechst 33342. En ambos casos las células del compartimento P expresan GFP. Con este método comparamos dos variables: la intensidad de la señal GFP, que diferencia las células integrantes de los compartimentos A y P, con la intensidad de señal del colorante fluorescente *Hoechst* 33342, que tiñe el DNA y refleja por tanto el contenido de DNA (2C o 4C). Se diseccionaron y acumularon unos 100 discos de ala de cada genotipo en PBS a 4 °C durante un máximo de 2 h. Se centrifugaron 1 minuto a 5000 r.p.m. y se incubó la muestra en 300 µl de Tripsina-EDTA (Sigma T-4299) con 0,5 µl de Hoechst 33342 (10 mg/ml) (Invitrogen) a 28 °C en oscuridad y con agitación durante 30 a 40 min. Posteriormente, se disgregaron las células pipeteándolas suavemente y se añadieron 200 µl

MATERIALES Y MÉTODOS

de PBS+FBS 1% (Suero Fetal Bovino) a 4 °C y se centrifugó cada muestra a 3500 r.p.m. durante 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 300 µl de PBS+FBS 1% a 4 °C.

Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur (*Becton Dickinson*) en el servicio de Citometría de Flujo del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Tras normalizar los datos, se utilizó el programa FlowJo 7.5 para su análisis y el modelo de *Dean-Jett-Fox* para el estudio de ciclo celular. El experimento se repitió un mínimo de cuatro veces, y sólo se tomaron en cuenta grupos poblacionales superiores a las 10000 células.

M2.4 Cultivo de células

La línea celular de embrión de *Drosophila* Schneider2 R+ (S2 R+, regalo de R. Barrios) se mantuvo a 25 °C en medio Insect X-Press (Lonza) enriquecido con suero fetal bovino al 7%. Se transfectaron con los plásmidos pAc-V5-ex o pAc-Myr-V5-ex (regalo de D.J. Pan) (Ling *et al.*, 2010) y pAC-aPKC-CA (cedido por A. Sobrado) en los que los genes indicados se expresan bajo el control del promotor constitutivo del gen *Actina 5c*. Para la transfección se empleó el sistema de electroporación *Amaza Cell Line Nucleofector Kit V* (Lonza), utilizando 2 µg de DNA plasmídico por cada transfección de 2 x 10⁶ células, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

M3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

M3.1 Análisis de DNA

La transformación de células competentes de *E. coli* (de la cepa DH5alpha) con los plásmidos pAc-V5-ex o pAc-Myr-V5-ex, la preparación de DNA plasmídico, el análisis de restricción y la secuenciación de DNA se llevó a cabo siguiendo protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 2001).

M3.2 Extracción de proteínas

Se lisaron las células S2R+ por homogeneización en hielo en 200 µl de buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% NP-40; 150 mM NaCl; 0,25% Deoxicolato sódico; 1mM EDTA) con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 200 µg/ml; aprotinina 8 µg/ml; benzamidina 10 µg/ml e inhibidor de Tripsina 10 µg/ml) y los inhibidores de fosfatasa NaVO_4 1mM y NaF 25mM, durante 90 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

M3.3 Cuantificación de proteínas

La determinación cuantitativa de proteína total procedente de los extractos celulares se obtuvo con el método espectrofotométrico de Löwry, calibrando con BSA y midiendo a 660 nm (Lowry *et al.*, 1951).

M3.4 Ensayo de defosforilación

Se empleó la fosfatasa alcalina de intestino de ternero CIP (*calf intestinal phosphatase*) añadiendo una unidad por cada 2 µg de proteína del lisado e incubando durante 1 h a 37 °C. En el caso de células tratadas con CIP no se añadieron inhibidores de fosfatasa al medio de lisis.

M3.5 Ensayo de inhibición de PKC

Para inhibir la actividad del grupo de quinasas PKCs se añadió al cultivo el inhibidor genérico Cloruro de Cheleritrina (Herbert *et al.*, 1990) a una concentración de 10 mM 2 h antes del lisado de los mismos.

M3.6 Separación de proteínas por PAGE

La separación de proteínas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% con SDS al 1%, (PAGE-SDS). Se desnaturalizaron las muestras (30-50 µg proteína por carril) a 95 °C durante 5 min en tampón de desnaturalización Laemmli (Laemmli, 1970) (62 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 0,08% (p/v) azul de bromofenol y 5% (v/v) β-mercaptoetanol) en proporción 3:1 muestra:tampón. La electroforesis se realizó a un voltaje de 80 mV y 100 mV en las fases de gel concentrador y gel separador respectivamente utilizando el tampón TBE.

El análisis de la movilidad diferencial de fosfoproteínas se realizó en geles de poli-acrilamida al 6% con 100 µM *Phos-tag* (Wako Chemicals). Los geles se prepararon según las especificaciones de la casa comercial.

M3.7 Western Blot

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-N, Amersham Biosciences) aplicando un campo eléctrico durante 90 min a 300 mA o durante toda la noche a 15 mA en una cubeta Bio-Rad. Para la detección de fosfoproteínas separadas por electroforesis en geles con *Phos-tag* se realizó la transferencia durante toda la noche a 30 mA. Se realizaron 3 lavados de la membrana con PBS-Tween 0,1% y se bloqueó con PBTw-BSA al 3%. Para detectar proteínas fosforiladas se utilizó tampón de bloqueo (PBS + 0,1% Tween20 con 3% de *PhosphoBlocker*, Cell Biolabs). Las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios (anti-aPKC de conejo (1:2000, Santa Cruz) o anti-V5-HRP (1:5000, Invitrogen). Posteriormente se aclaró la membrana 3 veces y se lavó 3 veces durante 10 min con PBTw. Se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo-HRP, dilución 1:2000, en el caso de tinción con anti-aPKC) durante 1 h, se aclaró con PBTw y se reveló con ECL (GE Healthcare) en placa fotográfica (Agfa).

M4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

M4.1 Microscopía óptica

Las imágenes en campo claro de discos imaginales montados en Bálsamo de Canadá, de alas y adultos se tomaron con una cámara DCF425 (Leica) acoplada a un microscopio AxioPhot (Zeiss).

M4.2 Microscopía laser confocal

Las imágenes de inmunofluorescencia se obtuvieron utilizando los equipos de microscopía laser confocal disponibles del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa:

- Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss).
- Microscopio de Barrido Láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss).

También se emplearon, aunque en menor medida:

- Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss).
- Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss).

M5. ANÁLISIS *IN SILICO*

Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron y procesaron empleando los programas Zeiss LSM Image Browser v 4.2.0.121 o Image J v 1.46r.

Para el montaje de las figuras se emplearon *Adobe Photoshop CS6* y *Adobe Illustrator CC*.

El tamaño de las alas y de las regiones usadas para la estimación del índice mitótico se determinó mediante el programa Zeiss LSM Image Browser v 4.2.0.121.

Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en discos imaginales (Figura R6) se empleó el programa Image J v 1.46r.

El análisis estadístico se llevó a cabo en hojas de cálculo *Microsoft Excel* y *Prism6* de *Graphpad*. Las barras de error en las figuras corresponden a la desviación estándar. Se tomaron como estadísticamente significativos los valores de $p < 0,01$ (*), $p < 0,001$ (**) o $p < 0,0001$ (***).

La predicción de los sitios de fosforilación de Expanded se realizó con el programa Net phosk 1.0.

El diseño de cebadores se realizó con el programa *Primer 3*.

RESULTADOS

R1. La sobreexpresión de DaPKC constitutivamente activa causa el sobrecrecimiento de los discos imaginales de ala

R1.1 El crecimiento excesivo de los discos imaginales asociados a la sobreexpresión de DaPKC^{CAAXwt} se debe a su actividad como proteína quinasa

A lo largo de esta Tesis y para estudiar el efecto de la sobreexpresión de aPKC constitutivamente activa, empleamos la línea de moscas *UAS-aPKC^{CAAX-wt}* generada en nuestro laboratorio (Sotillos *et al.*, 2004), que en presencia de Gal4 expresa una isoforma dirigida a membrana por contener el dominio CAAX. Esta proteína presenta una distribución cortical generalizada cuando se expresa en el epitelio embrionario (Sotillos *et al.*, 2004). Analizamos la localización subcelular de DaPKC^{CAAX-wt} expresada en el compartimento posterior (P) de los discos imaginales de ala bajo el control de la línea *en-Gal4*. La tinción con anticuerpo frente a aPKC muestra que DaPKC^{CAAX-wt} se encuentra asociada a la membrana de las células del disco a lo largo de todo su contorno (Figura R1E', asterisco), no estando restringida al dominio apical como ocurre en las células de discos control (Figura R1B', puntas de flecha) o en el compartimento anterior (A) de discos *en-Gal4*; *UAS-aPKC^{CAAX-wt}* (Figura R1E', punta de flecha).

Comprobamos que la redirección de DaPKC a la membrana causaba su activación. Una vez activada, aPKC sufre un proceso de autofosforilación (en el caso de PKC ζ en el aminoácido T555 y en PKC λ en la T563 (Newton, 2010), de modo que la presencia de pT555-aPKC indica que esta proteína quinasa se encuentra activa. Al teñir con el anticuerpo α -pT555-aPKC discos imaginales de larvas *sal-Gal4/UAS-DaPKC^{CAAXwt}* observamos la acumulación de P-aPKC en el dominio de expresión de la línea Gal4 (Figura R2 A-C). Por ello, a partir de este punto llamaremos aPKC-Constitutivamente Activa (aPKC-CA) a DaPKC^{CAAXwt} y al territorio que sobreexpresa aPKC-CA lo denominaremos, para simplificar, territorio mutante *aPKC-CA*.

RESULTADOS

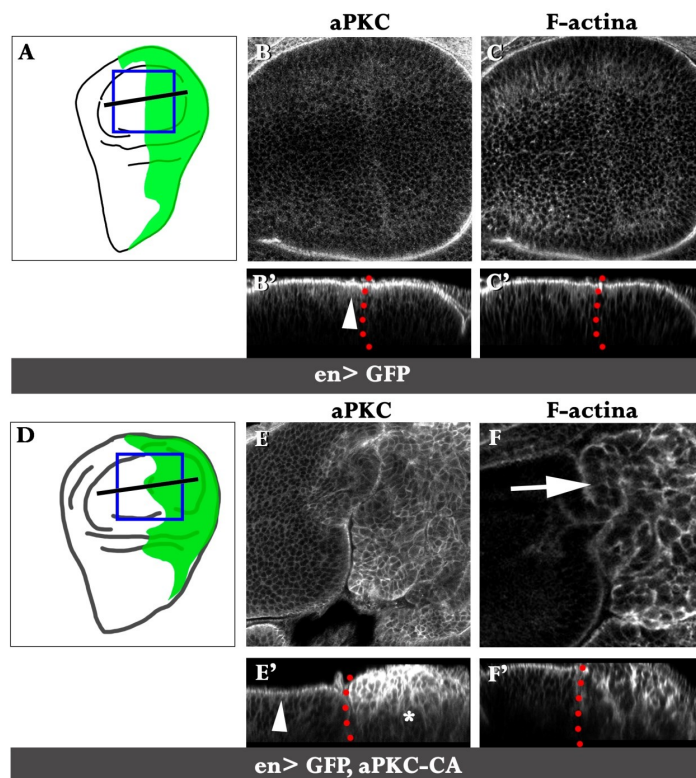


Figura R1. La sobreexpresión de *aPKC-CA* en el disco de ala altera la estructura del epitelio (A, D) Esquemas de discos de ala. En verde se marca el compartimento posterior; el recuadro azul indica la zona ampliada en las imágenes B, C, E y F. (B-C', E-F') Discos control *en> GFP* (B-C') o discos mutante *en> GFP; UAS-DaPKC-CA* (E-F') teñidos con anticuerpo frente a aPKC (B, B', E, E') o con faloidina (C, C', F, F'). B, C, E y F corresponden a secciones ópticas tangenciales. En B', C', E' y F' se muestran secciones sagitales realizadas al nivel del disco marcado con una línea negra horizontal en los esquemas. El borde entre compartimentos A/P está marcado

con línea de puntos rojos (determinado por la expresión de GFP, no mostrado). (B',E') La punta de flecha indica la localización apical normal de aPKC. (E') El asterisco indica la deslocalización de aPKC a todo el contorno celular en el compartimento posterior mutante. (F) La flecha señala el aumento en los niveles de F-actina en el compartimento mutante. En las imágenes que presentan cortes sagitales, apical está arriba y basal abajo.

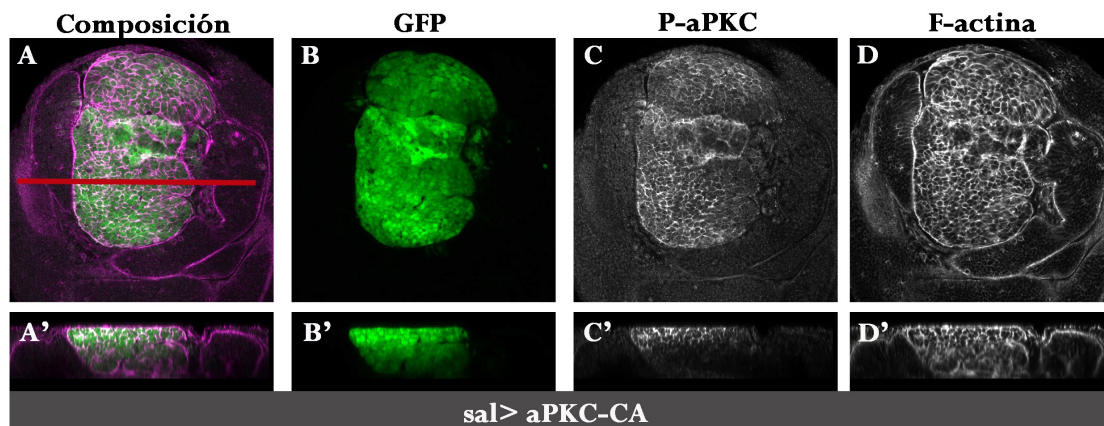


Figura R2. Activación de aPKC por su redirección a la membrana plasmática mediada por la secuencia CAAX. Cortes tangenciales (A, B, C, D) y sagitales (A', B', C', D') (realizados al nivel del disco marcado con una línea roja horizontal en A) de discos *sal> GFP; UAS-DaPKC-CA*. (B, B') Expresión de GFP en el dominio *sal*. (C, C') Tinción con anticuerpo anti p-T555 aPKC. Nótese la acumulación de p-aPKC en las membranas celulares en el dominio *sal*. (D, D') Obsérvese la acumulación de actina filamentosa (tinción con faloidina) y la formación de pliegues en el territorio mutante.

Asimismo observamos que, de acuerdo con resultados previos (Sotillos *et al.*, 2004; Grifoni *et al.*, 2007), el crecimiento excesivo de los discos imaginales asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA (ver Figura I6) se debe a su actividad como proteína quinasa y no a la presencia de altos niveles de aPKC, ya que ni la sobreexpresión de aPKC^{WT} (Figura R3 B-E') ni de aPKC-DN (Figura R3 D-F') produjeron alteraciones visibles en el tamaño o en la estructura de los discos. De acuerdo con estos resultados, los adultos que expresan *UAS-DaPKC^{WT}* o *UAS-DaPKC-DN* en los discos imaginales de ala bajo el control de *sal*-Gal4 o *en*-Gal4 son viables y presentan alas normales (Figura R3G, H y Sotillos *et al.*, 2004; Grifoni *et al.*, 2007).

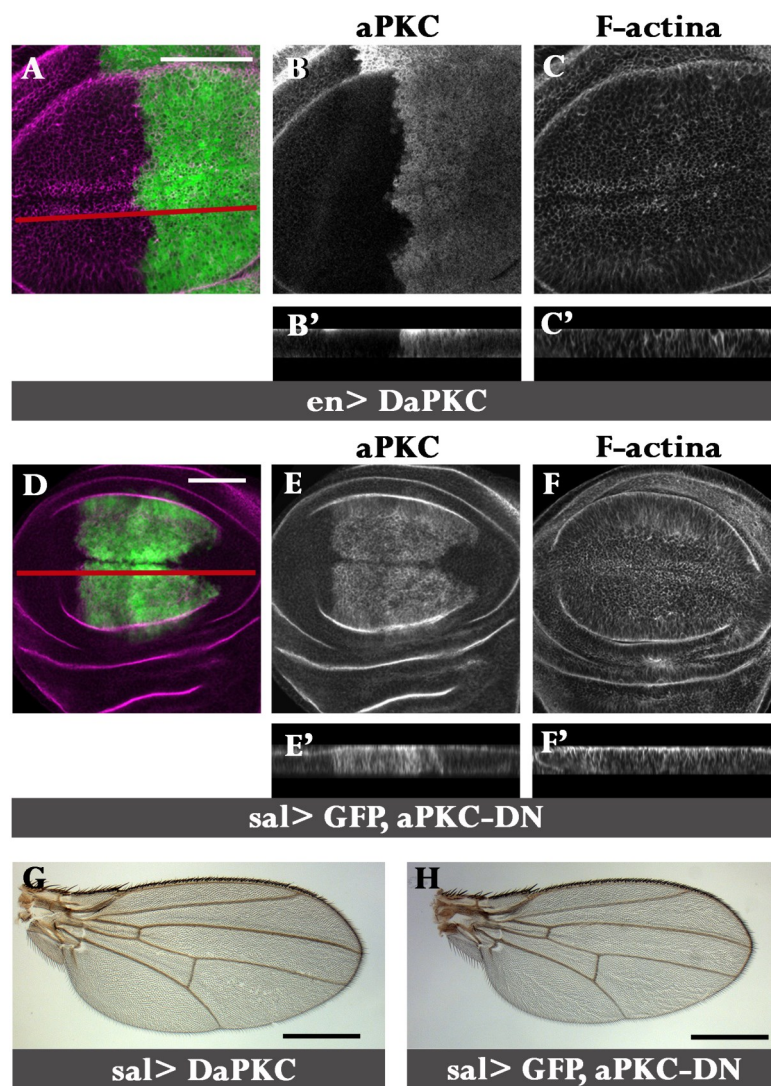


Figura R3. El incremento en los niveles de aPKC-wt o aPKC-DN no afecta al desarrollo del disco imaginal de ala. (A-F') La sobreexpresión de *UAS-aPKC^{wt}* en el compartimento posterior de discos de ala dirigida por *en*-Gal4 (A-C') o de *UAS-aPKC^{CAAX-DN}* en el dominio central del ala (dirigida por *sal*-Gal4, D-F') no afecta ni al tamaño de estos dominios ni a la estructura del epitelio (visualizada por tinción con faloidina, C, C', F, F'). (B, B', E, E'). Los niveles de proteína aPKC están aumentados en las dos condiciones mutantes. (G, H) No se aprecian cambios morfológicos en las adultas correspondientes. Cortes tangenciales (A-C, D-F) y sagitales (B', C', E', F') realizados al nivel del disco marcado con las líneas rojas horizontales en A y D). Barras de calibrado de 50μm (A, D) y 500 μm (G, H).

RESULTADOS

R1.2 La sobreexpresión de aPKC-CA en amplias regiones de los discos imaginales y en epitelio folicular causa su crecimiento excesivo y distorsiona la estructura del epitelio

En primer lugar analizamos las consecuencias fenotípicas de la sobreexpresión de aPKC-CA en grandes regiones de los discos imaginales de ala.

El efecto de la expresión de aPKC-CA depende de la región del disco de ala en donde tiene lugar. Así, mientras que la expresión en regiones del ala o en la axila alar (Figuras I6, R1E-F, R2, R4 E, F, G) causa sobrecrecimientos y altera la forma de los discos, la expresión en el notum proximal dirigida por la línea *pnr*-Gal4 no tiene ningún efecto aparente (Figura R4 D, H).

La sobreexpresión de aPKC-CA dirigida por *en*-Gal4 afecta a la supervivencia de los organismos. De acuerdo con la mayor eficiencia de la proteína Gal4 como activador transcripcional al aumentar la temperatura (Duffy, 2002), el porcentaje de supervivencia varía según la temperatura de desarrollo de las larvas, siendo menor a mayor temperatura (Figura (S)uplementaria S1).

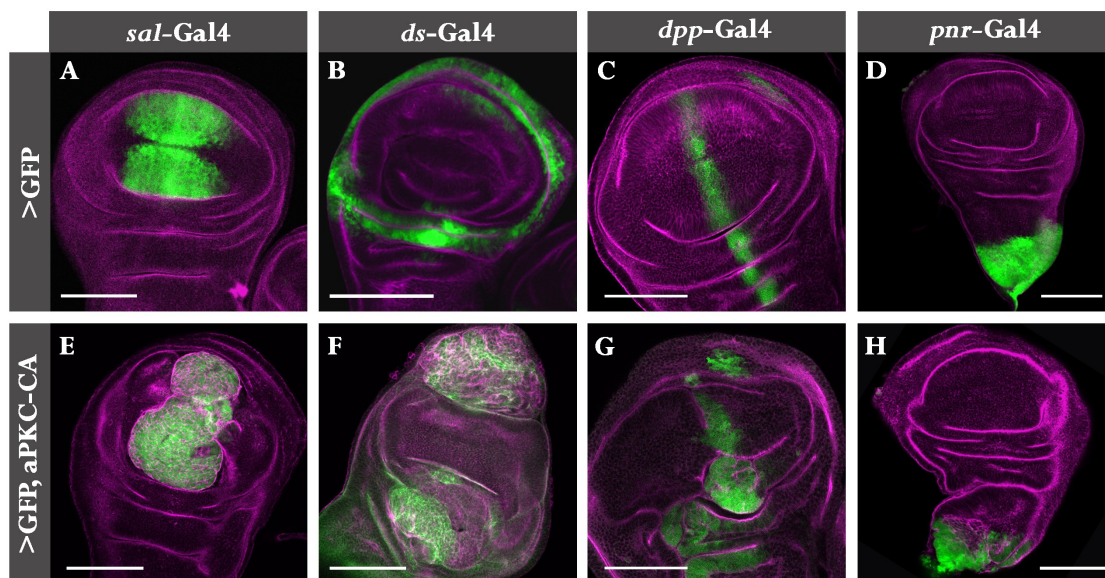


Figura R4. Respuesta de diferentes regiones del disco de ala a la sobreexpresión de aPKC-CA. (A-D) Dominios de expresión de las diversas líneas Gal4 empleadas (en verde, definidos por la expresión de GFP). (E-H) Efecto de la expresión de *UAS-DaPKC-CA* en los diversos dominios. Obsérvese cómo aumenta el tamaño de los territorios de ala (E, G) y de axila alar (F, G) al expresar en ellos aPKC-CA. La sobreexpresión tuvo lugar durante todo el estadio larvario a 25 °C. La tinción con faloidina se muestra en magenta. Barras de calibrado de 100 μm.

A nivel celular, observamos que la sobreexpresión de aPKC-CA causa alteraciones en el citoesqueleto de actina, la cual se acumula a mayores niveles que en las células de tipo silvestre y pierde su localización subapical (Figuras R1 C, C', F, F' y R2 A, D). Por otro lado, las células pierden su forma columnar y pasan a tener un aspecto redondeado (Figura R1 E, F) con un aumento de su superficie apical (Figura R1F). Se aprecia la aparición de numerosos pliegues (visualizados por tinción con faloidina), en las regiones en donde se expresa aPKC-CA, resultado del intento de acomodar el tejido generado en exceso dentro de los límites físicos del disco imaginal (Figuras R1F, F' y R2 A, D).

Sobreexpresamos también aPKC-CA en el disco imaginal de ojo-antena para analizar si los efectos fenotípicos descritos en el disco de ala eran similares en otros discos. Observamos la disgregación de los discos de ojo antena ya en el tercer estadio larvario (Figura S2) incluso cuando se habían mantenido los cruces a 17°C. Los adultos faratos disecados del pupario (ya que eran incapaces de eclosionar) carecían de ojo y de todas las demás estructuras derivadas del disco de ojo antena (Figura S2).

La sobreexpresión de aPKC-CA en el epitelio folicular (analizada por A. Rodríguez-Learte en nuestro laboratorio) causó de modo similar grandes alteraciones en la estructura de este epitelio, observándose cambios en la forma de las células foliculares y su crecimiento masivo (Figura S3).

R1.3 aPKC-CA incrementa la proliferación celular

Nos preguntamos si el excesivo tamaño de las regiones de los discos imaginales que expresan aPKC-CA se debía a un incremento en su ritmo de proliferación. Utilizamos varios métodos para estudiar esta cuestión. Las células en fase de mitosis o fase M pueden detectarse por tinción con un anticuerpo que reconoce a la histona H3 fosforilada en la serina 10 (pH3), (Wei *et al.*, 1998). Realizamos tinciones con este anticuerpo en discos de ala que coexpresan aPKC-CA y GFP en el compartimento posterior y en discos control *en-Gal4, UAS-GFP* (Figura R5 A, B) y calculamos el índice mitótico relativo entre los compartimentos P y A (índice P/A, ver Materiales y Métodos M 2.1.3) para normalizar los

RESULTADOS

resultados. En la Figura R5 C se muestran los valores del índice mitótico relativo P/A contabilizado en células del disco propio de la región presuntiva de ala. El valor de este índice en un disco control se encuentra próximo a 1 ($1,04 \pm 0,06$; $n=9$), Martin y Morata, 2006). La diferencia con el valor obtenido en discos que expresan aPKC-CA durante 24 horas a 25°C ($1,14 \pm 0,53$; $n=6$) no es estadísticamente significativa pero sí lo es tras 48 horas de expresión de aPKC-CA a 25°C ($2,11 \pm 0,90$; $n=10$; $p<0,001$).

Cuando se compararon los índices mitóticos P/A teniendo en cuenta toda el área de los compartimentos anterior y posterior o considerando también las células en mitosis del epitelio peripodial se obtuvieron resultados similares (Figura S4).

El aumento de células en mitosis es indicativo, pero no concluyente, de un incremento proliferativo, por lo que se examinó también la distribución de células en la fase S del ciclo celular por experimentos de incorporación del análogo de Timidina EdU ((Chehrehasa *et al.*, 2009), Figura R5 D-F). En discos control, la incorporación de EdU tras 15 minutos de incubación fue homogénea en todo el disco (Figura R5 D, D') mientras que la incorporación en los discos mutantes *aPKC-CA* se encontró manifiestamente descompensada entre compartimentos, siendo mucho mayor en el compartimento P (Figura R5 E-F).

Para comprobar que lo que estaba ocurriendo en los discos que expresan aPKC-CA en el compartimento posterior era una aceleración en el ciclo celular en este compartimento y no una ralentización en el compartimento anterior y para determinar si se encontraba afectada alguna fase en concreto del ciclo celular, analizamos el perfil del ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura R5 G-I). Separamos por FACS (ver Materiales y Métodos 2.3) células GFP + y células GFP- de discos *en-Gal4, UAS-GFP* y *en-Gal4, UAS-GFP; UAS-aPKC-CA* teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33342 que se une al DNA. De este modo comparando dos variables, la intensidad de señal GFP, para distinguir las células integrantes de los compartimentos A y P, y el contenido de DNA (que permite identificar las fases del ciclo celular), se obtuvieron los perfiles de ciclo celular (número de células en cada fase del ciclo) en compartimentos que expresan aPKC-CA y en compartimentos control. Analizamos conjuntamente los resultados de las fases S-G2-M ya que según el modo de análisis (Dean-Jett-Fox o Watson) pueden variar las proporciones entre estas fases, pero

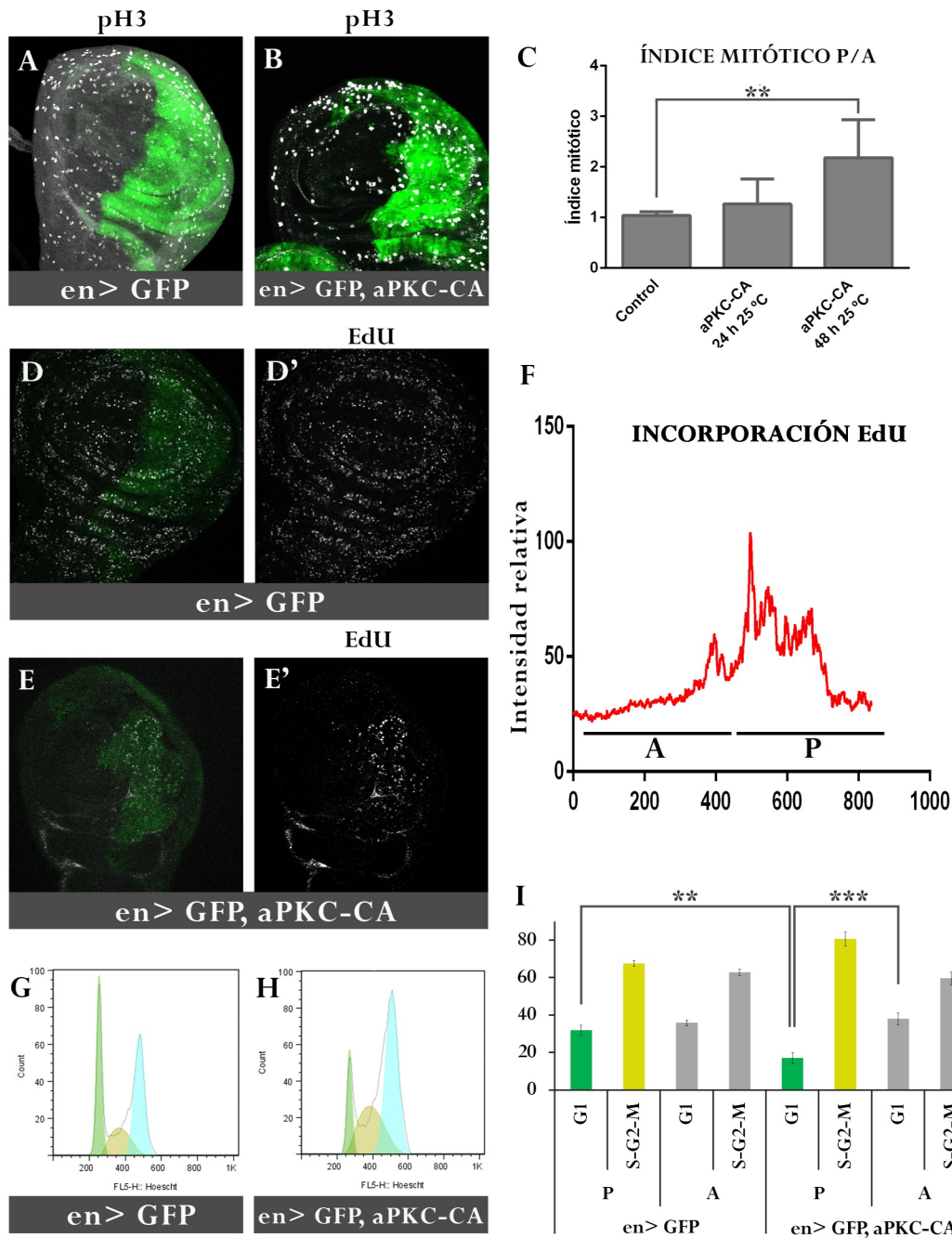


Figura R5. Las células que expresan aPKC-CA proliferan más que las células de tipo silvestre. Comparativa de los valores de varios marcadores de proliferación entre discos de ala control (*en-Gal4 UAS-GFP*) y discos que expresan aPKC-CA en el compartimento posterior (*en-Gal4 UAS-GFP; UAS-DaPKC-CA*). (A, B) Distribución de células en fase M en discos del genotipo indicado teñidos con anti-pH3. Se sobreexpresó aPKC-CA durante 48 horas a 25°C. Se muestra la superposición de varias imágenes del mismo disco, tomadas a intervalos de 1,4 μ m. (C) Cuantificación del índice mitótico relativo de discos control frente a discos en los que se sobreexpresó aPKC-CA durante 24 o 48 horas a 25 °C. (D-F) Distribución de células en fase S determinada por incorporación de EdU durante 15 minutos en discos control (D, D') y en discos *en-Gal4 UAS-DaPKC-CA* (E, E'). (F) Representación de la intensidad de la señal de incorporación de EdU a lo largo del eje A/P en discos *en-Gal4 UAS-DaPKC-CA*. (G-I) Análisis de perfiles de ciclo celular de discos control *en-Gal4, UAS-GFP* (G) y mutantes (*en-Gal4, UAS-GFP; UAS-DaPKC-CA*, H). (I) Porcentaje de células en distintas fases de ciclo celular. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

RESULTADOS

la suma de ambas siempre es la misma. La Figura R5 I muestran que mientras que en discos control el porcentaje de células en fase G1 es similar en el compartimento A y en el P ($35,8 \pm 1,6$ y $31,8 \pm 2,8$ respectivamente; $p=0,02$), es diferente de modo estadísticamente significativo entre los compartimentos A y P en los discos *en-GAL4, UAS-GFP; UAS-aPKC-CA* ($37,9 \pm 3,1$ y $17,1 \pm 3,0$ respectivamente; $p<0,0001$), indicando que las células P tienen acelerado el paso a través de G1-S. Asimismo el porcentaje de células en fase G1 de los territorios anteriores de discos control y mutantes *aPKC-CA* era similar ($35,8 \pm 1,6\%$ frente a $37,9 \pm 3,1$; $P=0,29$) pero significativamente diferente entre los territorios posteriores de discos control y mutantes ($31,8 \pm 2,8$ frente a $17,1 \pm 3,0$, $p<0,001$).

A la vista de estos datos podemos por tanto concluir que las células que expresan *aPKC-CA* proliferan más y más rápido que las células control, estando principalmente acelerada la transición G1-S del ciclo celular.

R1.4 La reducción del ritmo de proliferación celular por la sobreexpresión de *dacapo* revierte el fenotipo asociado a la sobreexpresión de *aPKC-CA*

Ya que la sobreexpresión de *aPKC-CA* incrementa la proliferación celular, investigamos si la reducción de la misma podría modificar el fenotipo mutante de los discos *aPKC-CA*. Para ello sobreexpresamos junto con *aPKC-CA* *Dacapo* (ortólogo de p21 humano), que inhibe la actividad del complejo Ciclina E/CDK2, esencial para el paso de G1 a S (Deng *et al.*, 1995; de Nooij *et al.*, 1996). En estas condiciones no sólo no se observa la hiperproliferación del compartimento mutante sino que la morfología del disco está mucho menos afectada que al sobreexpresar sólo *aPKC-CA* (Figura R6 C- C'', comparar con B-B'').

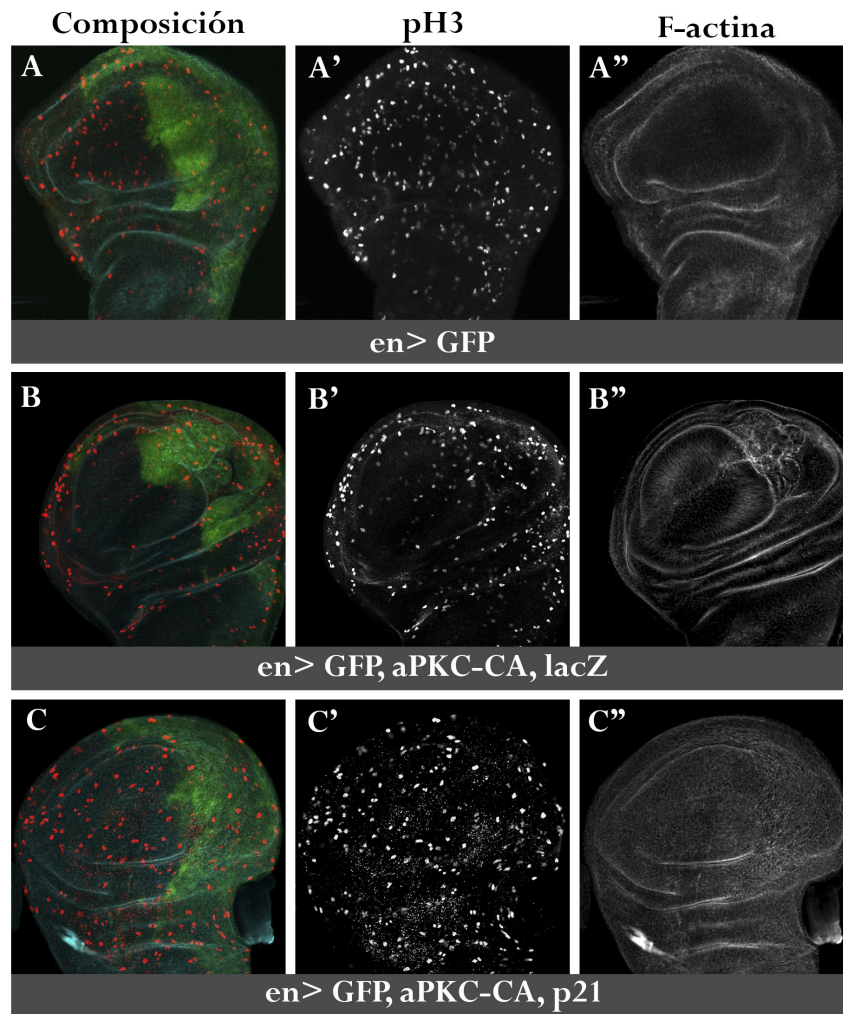


Figura R6. La expresión del inhibidor del ciclo celular *dacapo/p21* reduce el fenotipo asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA. Discos *en-Gal4 UAS-GFP* (A-A''), *en-Gal4 UAS-GFP, UAS-aPKC-^{CAAX-wt}, UAS-LacZ* (B-B'') y *en-Gal4 UAS-GFP, UAS-aPKC-^{CAAX-wt} / UAS-p21* (C-C''). El incremento de la proliferación en el compartimento P (marcado en verde) asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA y visualizado por tinción con anticuerpo anti-fosfohistona H3 (B') y la alteración en la morfología tisular (tinción con faloidina, B'') se corrigen al reducir la proliferación celular por expresión de dacapo (p21) (C-C'').

R1.5 La sobreexpresión de DaPKC-CA induce la muerte celular por apoptosis

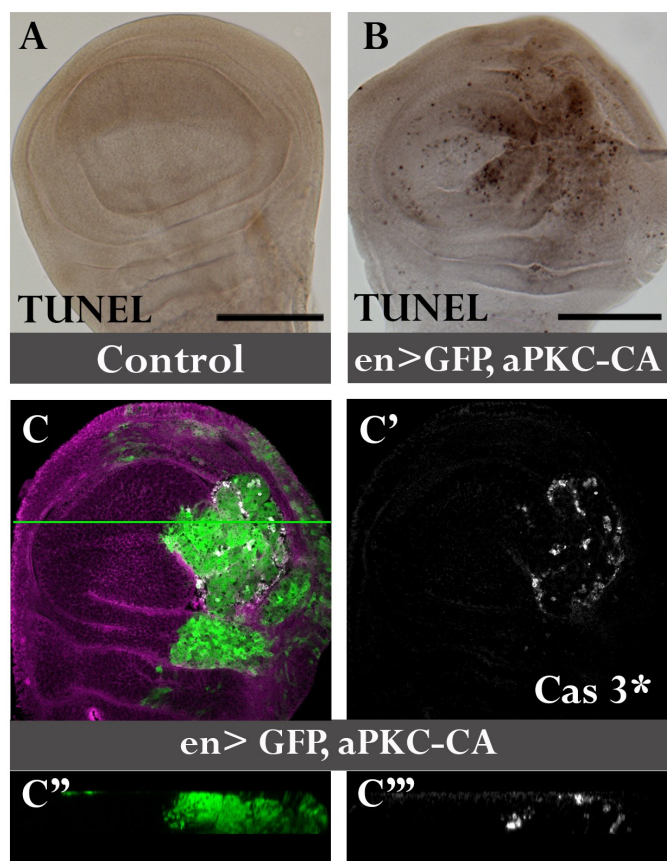
A pesar del incremento en la proliferación celular en regiones mutantes *DaPKC-CA* (Figura R5), las moscas adultas resultantes no presentan alas con un compartimento posterior de mayor tamaño que sus hermanas silvestres sino que se observan pérdida de tejido y zonas necrotizadas en este compartimento (Figura I6 B, D). Estas observaciones nos llevaron a pensar que parte del territorio que expresa aPKC-CA pudiera estar siendo

RESULTADOS

eliminado por apoptosis. Utilizamos dos métodos para determinar la presencia de células en apoptosis. La técnica de TUNEL (Gavrieli *et al.*, 1992, ver Materiales y Métodos M 2.1.4) permite detectar la presencia de DNA fragmentado, una de las características de las células en apoptosis (Skalka *et al.*, 1976). Como se observa en la Figura R7 A y de acuerdo con observaciones previas (Milan *et al.*, 1997) no se aprecian células en apoptosis en un disco control. Por el contrario son muy abundantes en discos *en-Gal4 UAS-aPKC-CA* (Figura R7 B). Algunas de las células en apoptosis parecen ser parte del compartimento A aunque el método TUNEL empleado no nos permitió establecer si eran células mutantes para *aPKC-CA* que habían invadido el compartimento A o células de tipo silvestre de este compartimento.

Para obtener una mejor definición a nivel celular de la apoptosis la analizamos mediante tinción con el anticuerpo que reconoce a la Caspasa 3 activada, una de las caspasas efectoras de la ruta apoptótica (Salvesen, 2002). Observamos la presencia de Caspasa 3 activada en las regiones que sobreexpresan *aPKC-CA*, principalmente en las fronteras con el territorio control (Figura R7 C', C''').

Figura R7. La sobreexpresión de DaPKC-CA causa apoptosis. (A, B) Detección de células en apoptosis por la técnica de TUNEL en discos de ala control (tipo silvestre, A) y *en-Gal4, UAS GFP UAS-DaPKC-CA* (B). Obsérvese en B el marcaje positivo para TUNEL en el compartimento posterior. (C-C''') Inmunotinción para caspasa 3 activada (mostrada en blanco) en discos mutante *en-Gal4, UAS-DaPKC-CA*. Gran parte de las células en apoptosis se localizan en el borde de la región mutante. La extensión del territorio mutante se muestra en verde (expresión de GFP en C y C''). El disco mostrado en C-C''' se encuentra teñido también con faloidina TRITC (en magenta en C).



Investigamos si bloqueando la apoptosis con la sobreexpresión de la proteína de baculovirus p35 (Hay *et al.*, 1994), se afectaría al tamaño las regiones del disco que sobre expresan aPKC-CA. Como se observa en la Figura R8, el tamaño de dichas regiones aumenta al impedir la apoptosis, sobre todo tras 96 horas de sobreexpresión de aPKC-CA (Figuras R8 C y F). Este efecto no era inesperado ya que se ha descrito anteriormente (Perez-Garijo *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2004) cómo el bloqueo de la apoptosis mediante la expresión de p35 permite el mantenimiento en el disco de células “undead”, inicialmente destinadas a morir pero mantenidas vivas de modo artificial, las cuales envían señales que activan el crecimiento de las células vecinas (Perez-Garijo *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2004; Perez-Garijo *et al.*, 2009; Morata y Herrera, 2013; revisado en Mollereau *et al.*, 2013).

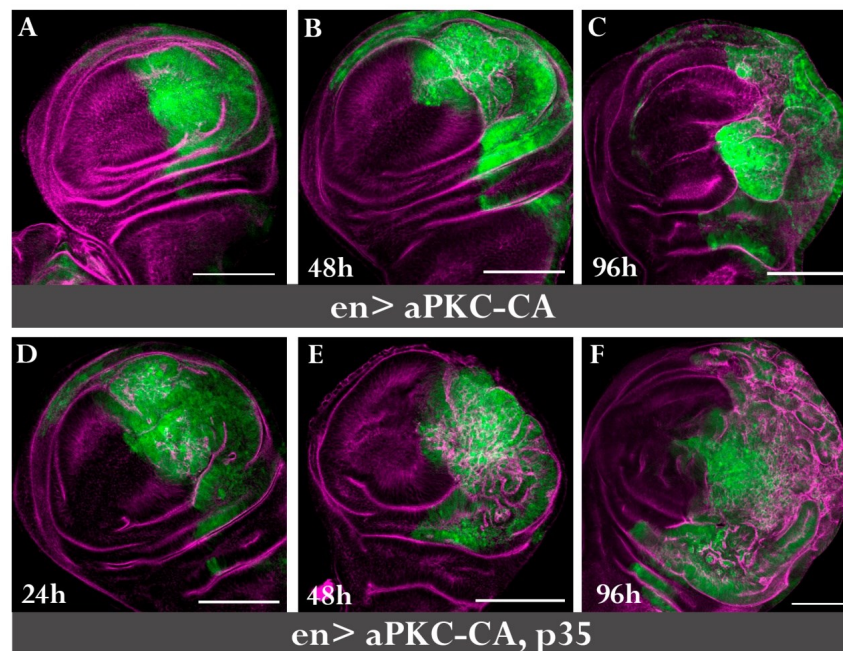


Figura R8. El bloqueo de la apoptosis aumenta el sobrecrecimiento asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA. Discos de ala mutantes *en-Gal4 UAS-GFP; UAS-DaPKC^{CAAXwt}* (A-C) o *en-Gal4 UAS-GFP; UAS-DaPKC-CA / UAS-p35* (D-F) extraídos tras 24 (A, D), 48 (B, E) o 96 (C, F) horas a 25 °C. A pesar de la presencia de un mayor número de genes dirigidos por la secuencia UAS en los discos mostrados en D-F frente a los de los paneles A-B, lo que podría titular la cantidad de proteína Gal4 presente y disminuir el nivel de proteína aPKC-CA en el compartimento mutante, nótese como aumenta el tamaño del compartimento P al co-expresar aPKC-CA y p35. La extensión del compartimento P se muestra en verde por la expresión de GFP. Barras de calibrado de 100 μm.

RESULTADOS

R1.6 La presencia de discos de ala mutantes para *aPKC-CA* prolonga el desarrollo larvario

Las larvas mutantes *lgl* nunca pasan a pupa y terminan muriendo tras varios días extra en estadio de larva durante los cuales aumenta el tamaño de los discos imaginales (Gateff y Schneiderman, 1974). Por los sobrecrecimientos del disco de ala observados al sobreexpresar *aPKC-CA*, decidimos estudiar si también se produce una prolongación del periodo larvario en estas condiciones experimentales. En la Figura R9 se muestra que las moscas que sobreexpresaban *aPKC-CA* en el compartimento posterior extendían su desarrollo larvario entre uno y dos días frente a las larvas control. Mientras que el 50% de las larvas control habían pupado antes del 9º día posterior a la puesta, esto no ocurrió hasta el día 11º en el caso de las larvas *en-Gal4; UAS-aPKC-CA*.

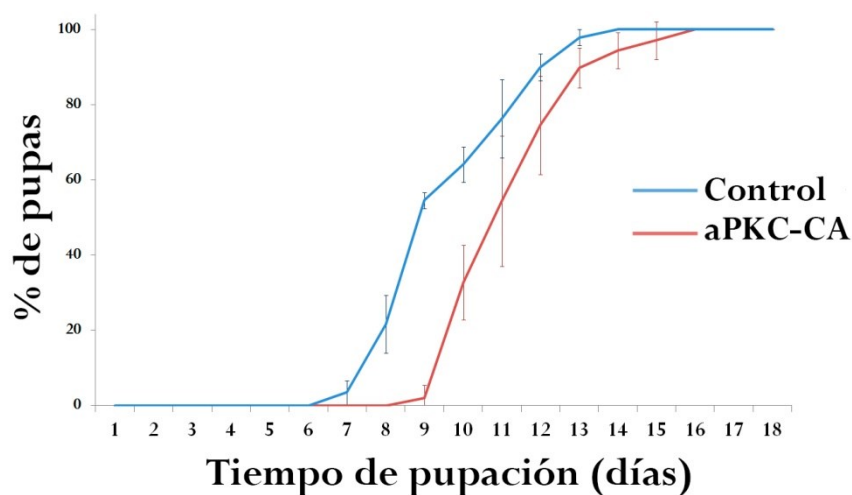


Figura R9. Estimación del tiempo de permanencia en el estadio larvario de larvas que expresan *aPKC-CA* en el disco de ala. Se mantuvieron las estirpes parentales control (*en-Gal4 UAS-GFP*) y mutante (*en-Gal4 UAS-GFP; UAS-DaPKC-CA*) 48 horas a 18°C para la puesta. Posteriormente se retiraron los adultos y se mantuvieron las larvas 48 horas más a esta temperatura para evitar la letalidad embrionaria asociada a la expresión de *aPKC-CA* controlada por *en-Gal4*. Finalmente se pasaron las larvas a 25 °C y durante dos semanas se procedió al recuento diario de nuevas pupas. El experimento se repitió tres veces. La gráfica indica el porcentaje de individuos que habían pupado cada día en función del tiempo transcurrido desde la puesta. La línea azul muestra la población control y la línea roja, la mutante.

R1.7 Alteraciones en la polaridad apicobasal y la adhesión intercelular asociadas a la sobreexpresión de aPKC-CA

La expresión de aPKC-CA en el embrión altera profundamente la polaridad apicobasal causando la redistribución de las proteínas del complejo Crumbs, Crb y PATJ, por todo el contorno celular y la eliminación de la membrana de proteínas basolaterales (Sotillos *et al.*, 2004). Sin embargo Crb no parece deslocalizado cuando se sobreexpresa aPKC-CA en un epitelio ya polarizado como es el disco de ala (Figura R10 B-B’’’). En el corte sagital (Figura R10 B’’’) se observan los pliegues en el epitelio que se generan por la expresión de aPKC-CA y la localización de Crb en el dominio subapical de las células que forman los pliegues.

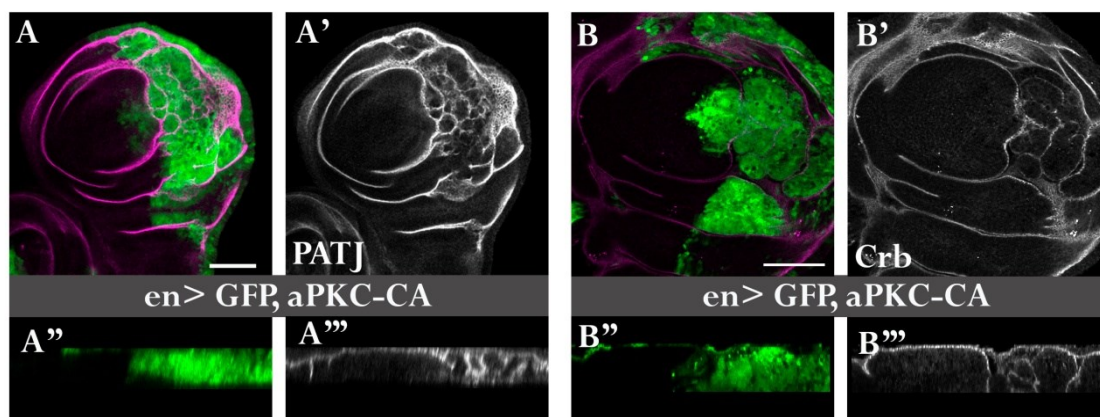


Figura R10. Localización de proteínas apicales en discos de ala que expresan aPKC-CA. Secciones ópticas tangenciales (A, A', B y B') y sagitales (A'' A''', B'' y B''') de discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP; UAS-DaPKC-CA* teñidos con faloidina (A, B, magenta) y con anticuerpos frente a las proteínas apicales PATJ (A', A''', en blanco) y Crb (B'-B''', en blanco). El territorio mutante está marcado por la expresión de GFP (en verde en los paneles A, A'' B, y B''). Barras de calibrado de 50 μ m.

Por el contrario sí que se modifica la localización de otras proteínas implicadas en el mantenimiento de la polaridad y adhesión celulares. Así, la proteína basolateral Dlg, que se localiza en células de tipo silvestre en posición basal a DaPKC (Figura R11 A'', flecha), se encuentra deslocalizada en citoplasma en el territorio mutante *aPKC-CA* (asteriscos en Figura R11 A'' y A'''). Por otro lado, se observa una gran disminución en los niveles de Cadherina E, un componente esencial de las uniones adherentes, al sobreexpresar aPKC-CA (Figura R11 B-B'') y la deslocalización de la proteína PATJ (Figura R10 B-B''').

RESULTADOS

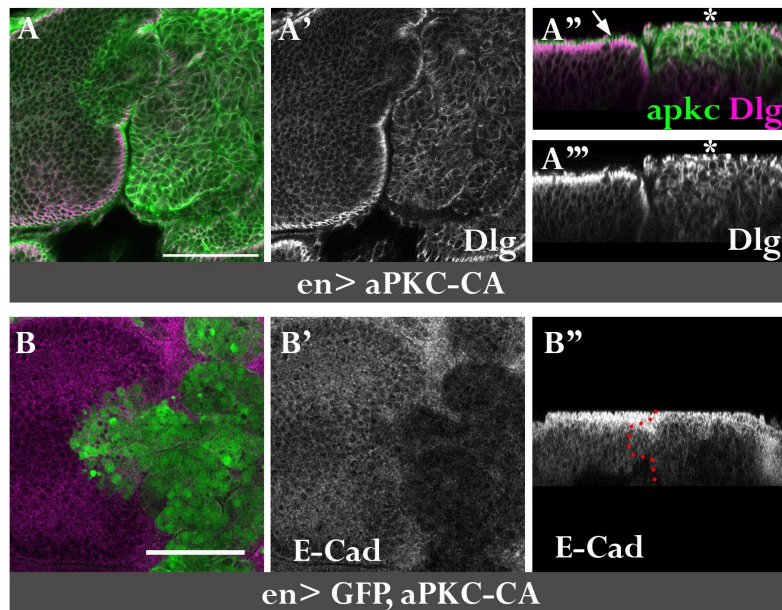


Figura R11. La sobreexpresión de aPKC-CA en el disco de ala altera la localización de la proteína basolateral Dlg y reduce los niveles de DE-Cadherina. Secciones ópticas tangenciales (A, A', B y B') y sagitales (A'', A''' y B'') de discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP; UAS-DaPKC-CA* teñidos con anticuerpos frente a aPKC (verde, A y A''), Dlg (magenta en A, A'' blanco en A', A''') y DE-Cadherina (magenta en B, blanco en B' y B''). En el panel A'' puede observarse en el compartimento anterior control la localización apical de aPKC y la localización más basal de Dlg (flecha). La localización de ambas proteínas cambia en el compartimento posterior mutante *aPKC-CA* (asterisco). (B' y B'') Los niveles de DE-Cadherina disminuyen sensiblemente en el territorio mutante. El territorio mutante está marcado en A y A'' por la expresión aumentada y deslocalizada de DaPKC y en B por la expresión de GFP. El límite entre los compartimentos A y P se marca con una línea discontinua roja en B''. Barras de calibrado de 50 μ m.

R1.8 Las células que sobreexpresan aPKC-CA muestran capacidad invasiva

El examen de discos de ala con compartimentos posteriores mutantes *aPKC-CA* muestra células mutantes que forman una masa con apariencia compacta que se introduce de un modo invasivo en el territorio control (compartimento anterior, Figura R12 B, B'). En la figura R12 D se observa también cómo la franja de células del dominio *dpp* (que se sitúa en el compartimento anterior adyacente al borde A/P, Figura R12 C) al expresar DaPKC-CA se disgrega parcialmente, tendiendo las células mutantes a invadir el compartimento P y el resto del compartimento A.

El estudio de la invasión en otro epitelio como es la cámara del huevo de *Drosophila* arroja resultados similares. Así, vemos cómo células foliculares mutantes para *aPKC-CA* invaden el territorio ocupado por las células nutricias (Figura S3 C).

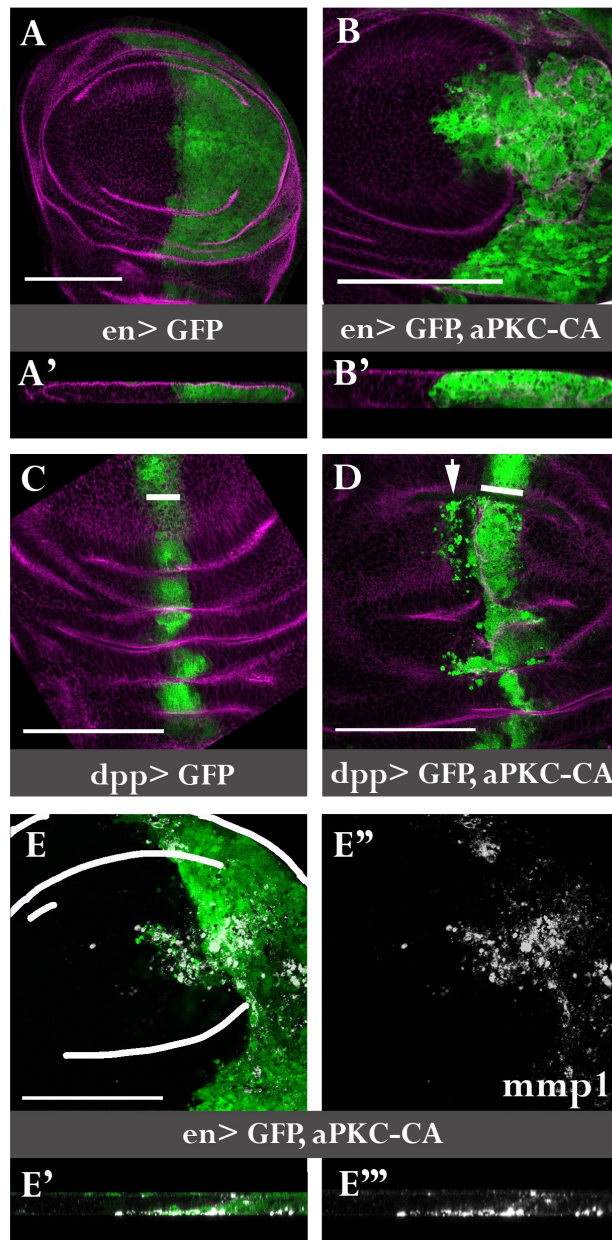


Figura R12. Ensayo de invasión por las células que expresan aPKC-CA.

(A-B') Discos de ala *en*-Gal4 *UAS-GFP* (A,A') y *en*-Gal4 *UAS-GFP*; *UAS-DaPKC-CA* (B, B'). Nótese la distorsión del borde recto de separación entre los compartimentos A y P (marcado en verde por la expresión de GFP) en los discos mutantes para *aPKC* comparado con los control. El territorio posterior invade y se introduce en el territorio anterior. (C-D) Discos de ala *dpp*-Gal4 *UAS-GFP* (C) y *dpp*-Gal4 *UAS-GFP*; *UAS-DaPKC-CA* (D). En el disco mutante, células que expresan aPKC-CA (flecha) abandonan el dominio *dpp* (marcado con una línea gruesa blanca). (E- E'') Activación de *mmp1* en las células del compartimento P (marcadas en verde en E y E') de discos *en*-Gal4 *UAS-GFP*; *UAS-DaPKC-CA*, determinada por tinción con anticuerpo anti-Mmp1. Las imágenes muestran cortes tangenciales (A, B, C, D, E y E') o sagitales (A', B', C', D', E' y E''). Barras de calibrado de 100 μ m.

Las metaloproteasas (Mmp) son enzimas endopeptidasas dependientes de Zinc encargadas de la degradación de la matriz extracelular. Están implicadas en procesos de recambio tisular en condiciones fisiológicas o asociadas a inflamación, en reparación de heridas y en procesos invasivos y metástasis (Stamenkovic, 2003; Limb *et al.*, 2005; Nagase *et al.*, 2006). La tinción con el anticuerpo anti-Mmp1 (Figura R12 E-E'') muestra niveles elevados de esta enzima en gran parte de las células que sobreexpresan *aPKC-CA*. Mmp1 se acumula principalmente en las células mutantes que se sitúan a nivel basal por debajo del territorio control. Estos resultados muestran que las células mutantes *aPKC-CA* son capaces de invadir un territorio adyacente, incluso evadiendo la barrera compartimental.

RESULTADOS

En conclusión, los sobrecrecimientos de tejido del disco de ala asociados a la sobreexpresión de DaPKC-CA muestran varios de los rasgos característicos de los crecimientos tumorales neoplásicos: hiperproliferación, alteración de la polaridad apicobasal y capacidad invasiva. Por el contrario y a diferencia de las células tumorales que evaden la apoptosis, los territorios mutantes para *aPKC-CA* presentan un elevado número de células en apoptosis.

R1.9 Los clones de células que sobreexpresan aPKC-CA son eliminados del epitelio del disco imaginal de ala

Las tinciones con anticuerpo anti-Cas3* muestran la presencia de células apoptóticas principalmente en las fronteras de confrontación entre el territorio mutante *aPKC-CA* y el territorio silvestre (Figura R7 C-C'') lo que sugería que las células que expresan *aPKC-CA* podrían estar siendo eliminadas por algún tipo de competición celular con las células vecinas de tipo silvestre. Para investigar esta cuestión recurrimos al análisis clonal que nos permite la generación simultánea de múltiples clones de células que expresan *aPKC-CA* y que se encuentran intercalados en el territorio silvestre con lo que el territorio “frontera” aumenta considerablemente. Además, para estudiar un modelo tumoral, el análisis clonal puede simular de un modo más fidedigno la aparición de tumores, ya que normalmente son pequeños grupos de células los que mutan y ocasionan los tumores en vez de amplias regiones (Vogelstein *et al.*, 2013).

Para obtener los clones de sobreexpresión de *aPKC-CA* utilizamos el sistema de generación de clones en *cis* (Ito *et al.*, (1997); ver Materiales y Métodos M 1.2.3.4). La obtención de estos clones es relativamente compleja pues son muy poco viables. Cuando una vez inducida la generación de clones se mantenían las larvas a 25°C hasta su disección, en muchas ocasiones no obteníamos ningún clon, o los clones resultantes eran muy pequeños (Figura R13 B-C') en comparación con los clones control de sobreexpresión de GFP realizados en las mismas condiciones (Figura R13 A, A'). Los clones de células que sobreexpresan *aPKC-CA* eran algo más frecuentes en la región de la axila alar y en el notum que en el territorio de ala. Estos clones no abarcaban todo el eje apicobasal del epitelio sino

que solían estar confinados a la región más basal del mismo (Figura R13 B') y presentaban Caspasa 3 activada (Figura R13 C, C') lo que indicaba que según iban proliferando las células del disco para formar los clones *aPKC-CA* iban siendo eliminadas por apoptosis.

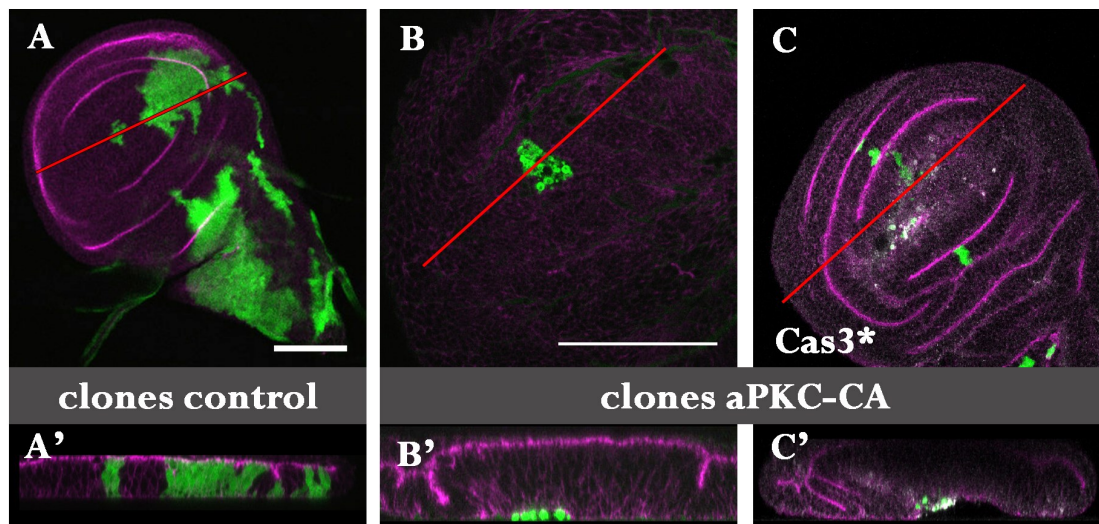


Figura R13. Los clones de sobreexpresión de *aPKC-CA* son eliminados del epitelio del disco de ala. (A) Clones control (que sólo expresan GFP, en verde) obtenidos tras un choque térmico de 8 minutos realizado a las 48 horas tras la puesta. Después del choque térmico, se mantuvieron las larvas a 25 °C hasta el estadio de LIII tardío. (B-C') Clones de sobreexpresión de *aPKC-CA* (en verde) generados en las mismas condiciones. (C, C') La tinción con el anticuerpo anti-Caspasa 3 activada (en blanco) muestra la apoptosis de las células mutantes. Obsérvese en las secciones sagitales la localización basal de las células mutantes (B' y C'), mientras que los clones control abarcan todo el espesor del epitelio (A'). Barras de calibrado de 50 μ m. Las líneas rojas (A-C) indican el punto de los cortes sagitales que se muestran en A'-C'.

Según esta hipótesis, reduciendo el tiempo de sobreexpresión de *aPKC-CA* podríamos llegar a obtener clones de un tamaño mayor. Para ello, indujimos la generación de clones por choque térmico de 15 minutos a 37°C (en vez de 8 minutos a 37°C para aumentar la frecuencia de clones) a las 24-48 horas tras la puesta, pasamos las larvas a 17°C (temperatura a la que Gal4 está inhibida por Gal80^{TS}) y dejamos transcurrir dos días más a esta temperatura. En estas condiciones, los clones proliferan en ausencia de *aPKC-CA*. A continuación pasamos las larvas a 29°C (para activar la expresión de *aPKC-CA*) y disecamos los discos 20 o 44 horas después. Como se observa en la Figura R14 hay un mayor número de clones y son de mayor tamaño que los que se muestran en la Figura R13. Observamos la presencia de células en apoptosis, cuyo número aumenta conforme es mayor el tiempo de sobreexpresión de *aPKC-CA* (Figura R14 C-D'). Las células apoptóticas se encuentran

RESULTADOS

preferentemente en los bordes de clones donde el territorio mutante contacta con el territorio silvestre (Figura R14 C-D'') existiendo también células dispersas en apoptosis, marcadas por GFP (y por tanto que expresan *aPKC-CA*) que se han desgajado de los clones (Figura R14 C-D').

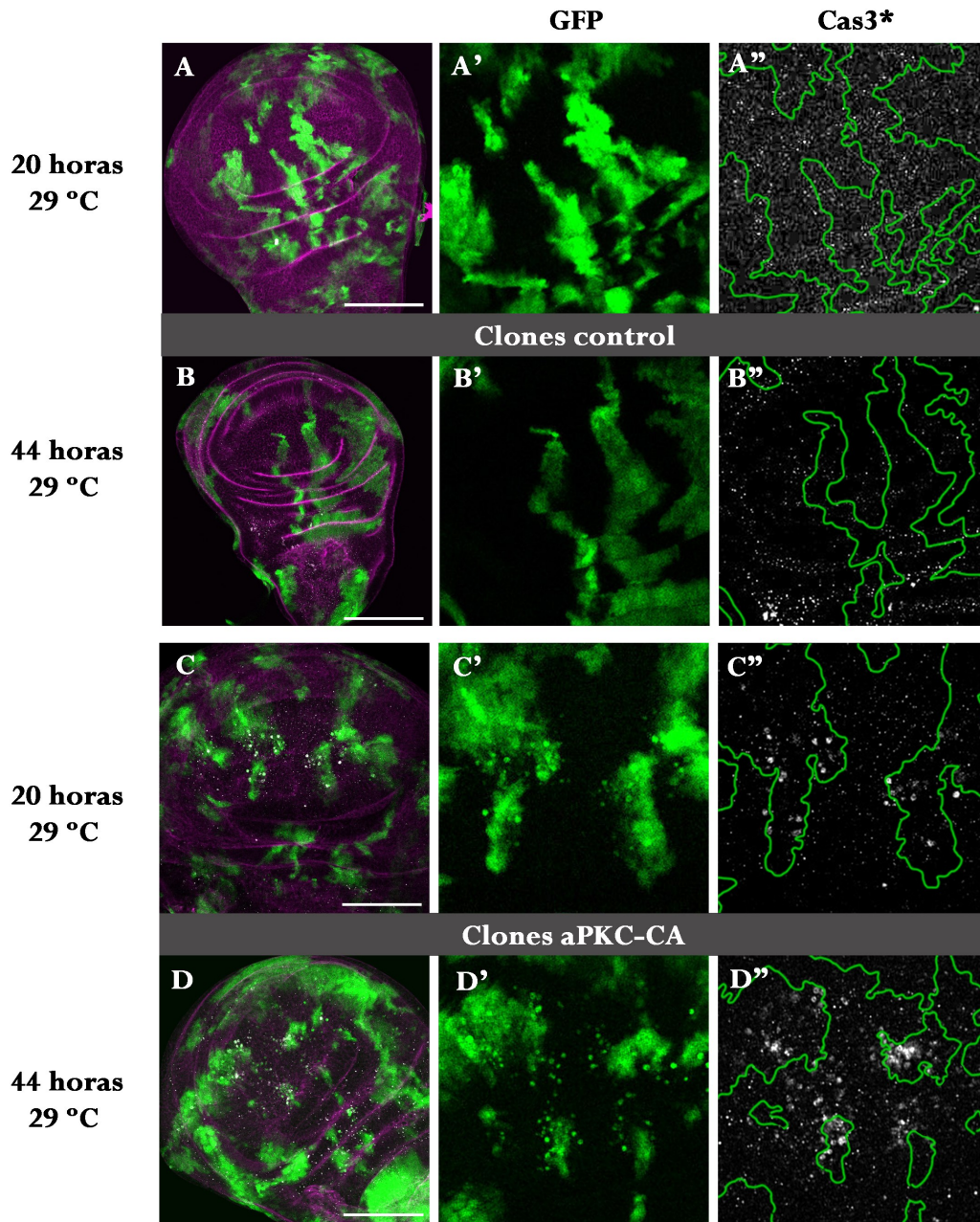


Figura R14. Las células en apoptosis se acumulan preferentemente en la frontera entre el territorio mutante *aPKC-CA* y el territorio de tipo silvestre. (A-B'') Clones control que expresan sólo GFP. Las pocas células que presentan expresión de caspasa 3 activada no se correlacionan con clones. (C-D''). Clones que expresan *aPKC-CA* y GFP durante el tiempo indicado (20 o 44 horas). Se detecta Caspasa 3 activada preferentemente en células mutantes *aPKC-CA* en contacto con células de tipo silvestre y también en células aisladas. Los genotipos de las larvas sometidas al choque térmico fueron *y w hs-FLP, Act FRT y⁺ FRT Gal4 UAS-GFP; UAS-LacZ/tub-Gal80^{ts}* (A-B'') y *y w hs-FLP, Act FRT y⁺ FRT Gal4 UAS-GFP; UAS-aPKC-CA/tub-Gal80^{ts}* (C-D'').

La poca viabilidad de los clones de células que expresan *aPKC-CA* contrasta con la capacidad de crecimiento (incluso de crecimiento excesivo) de compartimentos o amplios territorios del disco mutantes para *aPKC-CA*. Esto avala la hipótesis de que los clones de células que expresan *aPKC-CA* estén siendo eliminados por un proceso de competición celular con las células de tipo silvestre. De modo similar, clones mutantes para los supresores de tumores *lgl*, *dlg* y *scrib* son inviables en discos heterocigóticos para estas mutaciones mientras que los discos de larvas mutantes presentan un crecimiento excesivo (Bilder, 2004).

Menendez *et al.*, (2010) o Ballesteros-Arias *et al.*, (2013) han demostrado que territorios mutantes para los TSG *lgl* y *rab5* son eliminados del disco de ala si están rodeados de células que contienen estas proteínas pero persisten en el disco si el territorio mutante es lo suficientemente extenso como para crear un “microambiente” que protege a las células mutantes de la influencia negativa de las células vecinas. Para determinar si se podría rescatar por un proceso similar la poca viabilidad de los clones *aPKC-CA*, realizamos el experimento de generación de clones en *cis* aumentando la duración del choque térmico. De esta forma se consigue un número de clones, ya que al aumentar los niveles de la recombinasa flipasa, la probabilidad de que esta enzima catalice la recombinación de las secuencias FRT es mayor. Si aumenta el número de clones en un espacio finito, también es más probable que varios de ellos se unan formando un “clon” de gran tamaño que aísle a las células mutantes del “microambiente” (Menendez *et al.*, 2010).

Indujimos la generación de clones en *cis* entre 48 y 72 horas tras la puesta y mediante distintos tiempos de tratamiento térmico (8, 10, 15, 30 y 60 minutos) (Figura R15). Se realizó un recuento del número de discos de ala con clones (mutantes *aPKC-CA* o clones control) en la región presuntiva de ala (sin tener en cuenta el tamaño de los clones, solamente su presencia), comparando los tratamientos térmicos de 8, 15 y 60 minutos (Figura R15 G). Mientras que solamente encontramos clones de células que sobreexpresan *aPKC-CA* (normalmente pequeños y extruidos) en el 24,1% de los discos sometidos a choque térmico de 8 minutos (frente a un 78,9% de discos con clones control), el porcentaje de discos con clones mutantes y control se elevaba considerablemente (90,0% y 93,8%

RESULTADOS

respectivamente) si el choque térmico era de 15 minutos. Sin embargo, seguía siendo menor el territorio del disco ocupado por los clones que expresan *aPKC-CA* que el ocupado por los clones control (Figura R15 A, B, D, E, territorio marcado en verde) lo que indicaba una menor viabilidad de las células mutantes frente a las control. Solamente tras un choque térmico de 60 min, en el que todos los discos, tanto control como mutante, presentan clones en el ala (Figura R15 G) se igualaron los territorios mutante y control (en este caso, prácticamente todo el disco expresa GFP, Figuras R15 C, F). Con estos datos, podemos concluir que las células mutantes *aPKC-CA* sobreviven cuando no se encuentran rodeadas por un territorio más viable siendo necesario un tamaño mínimo del territorio mutante para dicha supervivencia.

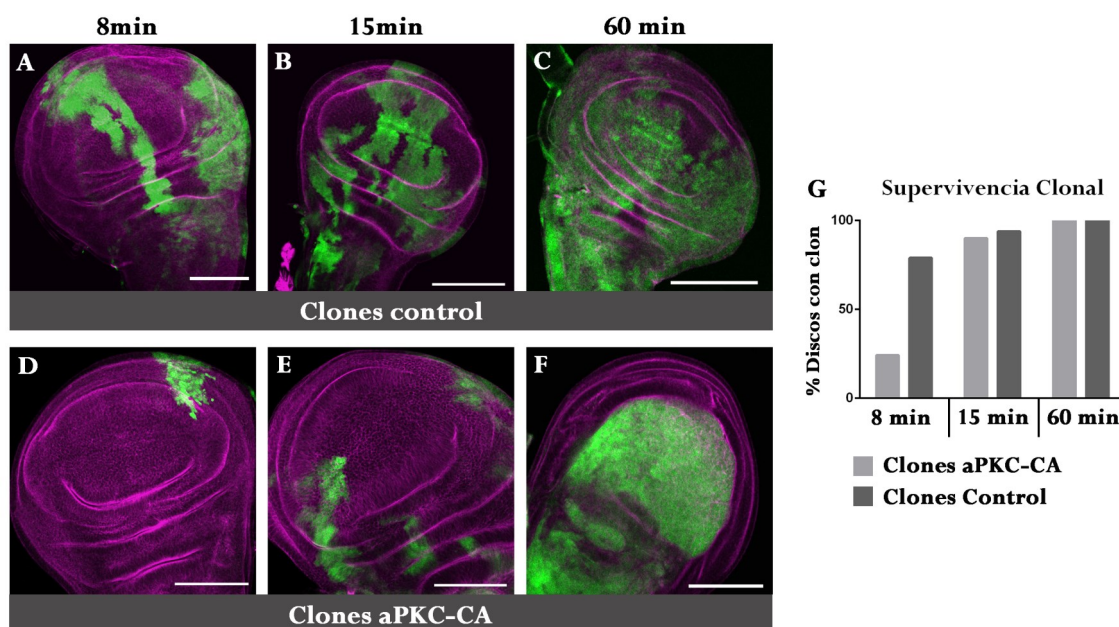


Figura R15. La supervivencia de células *aPKC-CA* se ve condicionada por el entorno. Clones control (A-C) o de sobreexpresión de *aPKC-CA* (D-F) generados a las 48 horas tras la puesta mediante choque térmico de 8, 15 y 60 minutos, respectivamente (D-F) administrado a larvas del genotipo indicado en la Figura R14. (G) Porcentaje de discos con clones en la región presuntiva del ala según el tiempo de choque térmico.

R1.10 La sobreexpresión de dMyc no aumenta la supervivencia de los clones *aPKC-CA* situados en la región presuntiva de ala

Diferencias en los niveles de expresión del proto-oncogén *myc* confieren a las células la capacidad de ser ganadoras o perdedoras en un proceso de competición celular, siendo las células ganadoras las que presentan mayores niveles de esta proteína (Abrams, 2002;

de la Cova *et al.*, 2004; Moreno y Basler, 2004). Ya que las células *aPKC-CA* se comportan como perdedoras, examinamos si tenían afectada la expresión de *d-myc*. Como se observa en la Figura R16 los niveles de dMyc disminuían, tanto cuando se inducía la sobreexpresión de *DaPKC-CA* en el compartimento P (Figura R16B-B'') como en clones de células (Figura R16 C-C'').

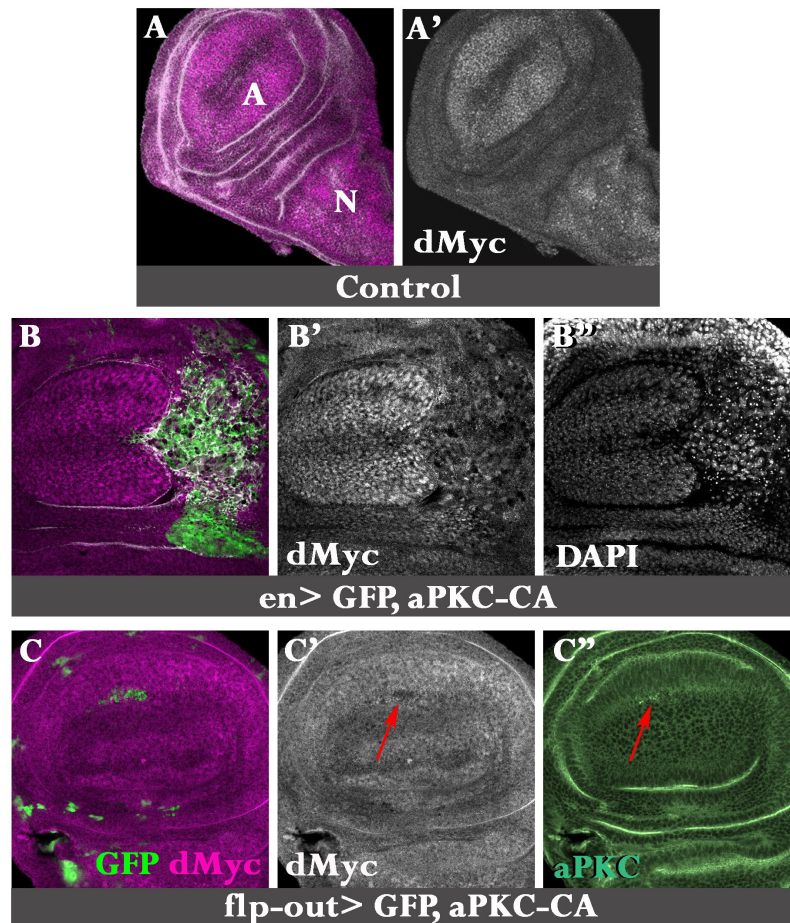


Figura R16. La sobreexpresión de aPKC-CA reduce los niveles de d-Myc. (A,A') Patrón de expresión de dMyc en discos de ala de tipo silvestre determinado por tinción con anticuerpo anti-dMyc. Los niveles más elevados de dMyc se observan en la región presuntiva de ala y de notum (Marcado con las letras (A) y (N) en A). (B-B'') Expresión de dMyc en discos *en-Gal4 UAS-aPKC-CA*. Los niveles de dMyc (B') están disminuidos en el compartimento P (en verde en B). La tinción con DAPI muestra la presencia de núcleos en el plano del disco enfocado en B''. (C-C'') Los niveles de dMyc bajan en clones de células que sobreexpresan aPKC-CA (marcados por la expresión de GFP, flechas rojas). En A, B, C se muestra en magenta la tinción con faloidina.

RESULTADOS

Para determinar si la bajada de dMyc contribuía a la eliminación de los clones mutantes para *aPKC-CA* generamos clones (Materiales y Métodos M 1.2.3.4.) clones en los cuales coexpresábamos *aPKC-CA* y *d-myc*. Comprobamos que la sobreexpresión en clones de *d-myc* no afectaba a la supervivencia celular (Figura R17 A) obteniéndose clones en una frecuencia y de un tamaño similares a los clones control que sólo expresan GFP (aunque hay que señalar que algunas células que sobreexpresan *d-myc* entran en apoptosis). Prácticamente la mayoría de discos en los que generamos clones de sobreexpresión de *aPKC-CA* no presentaba clones en la región presuntiva de ala, y los que había eran pequeños y apoptóticos (Figura R17 B), tal y como se ha descrito en apartados anteriores (Figuras R13 y R14). La supervivencia clonal en la región del ala no mejoraba al coexpresar *d-myc* y *aPKC-CA* (Figuras R17 C). Si bien ocasionalmente se observó la presencia de clones en el territorio de ala, los clones seguían siendo muy escasos y presentaban aspecto disgregado y extrusión basal (Figura R17 C-C’). Aumentamos la frecuencia de generación de clones con tratamientos térmicos más largos (de 15 minutos). En estas condiciones, en algunos discos se observaban clones grandes aparentemente situados en la región presuntiva de ala (Figura R17 D). Sin embargo un corte sagital (Figura R17 D’) mostraba que estos clones sobrecrecidos estaban formados por células de las pleuras que debido a su sobrecrecimiento se replegaban por encima de la región presuntiva de ala, pero no formaban parte de esta región. En algún caso incluso podía verse cómo en el mismo disco había clones que sobrevivían en la axila alar e incluso sobrecrecían en las pleuras pero en la región presuntiva de ala se estaban muriendo (Figura R17 E-E’). Por tanto, la expresión de *d-myc* puede compensar la baja viabilidad de los clones *aPKC-CA* dependiendo de la región del disco de ala. Mientras que en la axila alar o en la pleura la coexpresión de *d-myc* favorece el crecimiento de los clones *aPKC-CA*, llegando incluso a producir sobrecrecimientos que no se observan al expresar estos genes por separado, en la región presuntiva de ala no es capaz de rescatar su falta de viabilidad.

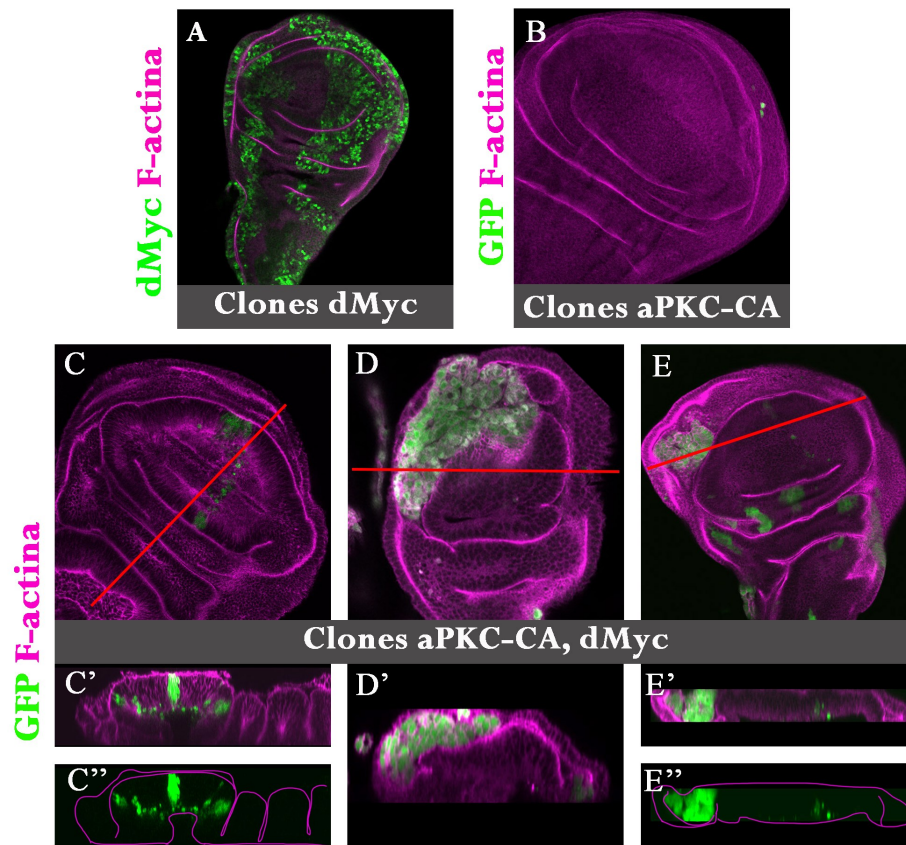


Figura R17. La co-expresión de *d-myc* mejora la supervivencia de los clones mutantes *aPKC-CA* en ciertas regiones del disco. (A) Clones de sobreexpresión de *d-myc* marcados por la expresión de d-Myc determinada por tinción con anticuerpo anti dMyc. (B-E) Clones de células que sobreexpresan *aPKC-CA* y GFP (B) o que co-expresan también *d-myc* (C-E'') marcados por la expresión de GFP. Los clones se generaron por activación de *hs-FLP* por 8 minutos (A-C) o 15 minutos (D, E) de choque térmico. Las barras rojas muestran la posición desde la que se observa la proyección en Z en las imágenes C', C'', D', E' y E''. En trazado morado, pliegues de actina en las imágenes C'' y E''. El genotipo de las larvas fue: (A), *y w hs-FLP; Act FRT y⁺ FRT Gal4 UAS- GFP; UAS- dMyc*; (B), *y w hs-FLP; Act FRT y⁺ FRT Gal4 UAS- GFP / UAS- DaPKC-CA*; C-E, *y w hs-FLP; Act FRT y⁺ FRT Gal4 UAS- GFP / UAS- DaPKC-CA; UAS- dMyc*.

R2. Mecanismo molecular del sobrecrecimiento asociado a la sobreexpresión de DaPKC constitutivamente activa en el disco de ala

En esta segunda parte de la Tesis nos propusimos tratar de identificar si el incremento de proliferación celular y de la apoptosis asociadas a la sobreexpresión de aPKC-CA se debían al funcionamiento erróneo de alguna de las vías de señalización intercelular que controlan dichos procesos en los discos imaginales, como son las vías de Notch, EGFR, Hippo, JNK y JAK-STAT, o si se trataba de una extensión de su papel como determinante de polaridad apicobasal. Se han identificado numerosos sustratos de la quinasa aPKC (Rosse *et al.*, 2010) por lo que su sobreexpresión en los discos imaginales es de suponer que pueda afectar a la actividad de diversas vías de señalización. En este trabajo hemos investigado la posibilidad de que interfiera con el funcionamiento de las vías de Salvador/Warts/Hippo (SWH), Notch y JNK basándonos en nuestros resultados previos y en los de otros autores.

R2.1 La sobreexpresión de aPKC-CA en el disco de ala inhibe la actividad de la vía de Salvador/Warts/Hippo

La vía de Salvador-Warts-Hippo (SWH) está evolutivamente conservada e interviene en el control del crecimiento de los órganos corporales modulando tanto la proliferación celular como la apoptosis (ver Introducción).

Varios estudios previos han demostrado que la actividad de la vía SWH está estrechamente relacionada con la arquitectura tisular ya que mutaciones en los genes *crb*, *lgl*, *scrib* y *aPKC* desregulan el funcionamiento de esta vía en los discos imaginales (Chen *et al.*, 2010; Grzeschik *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010; Menendez *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010; Sun y Irvine, 2011; Verghese *et al.*, 2012; Parsons *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014). Por otro lado, la acumulación de actina (que recordemos se encuentra incrementada en las células *aPKC-CA*) promueve la inactivación de la vía de SWH (Fernandez *et al.*, 2011; Sansores-Garcia *et al.*, 2011). Por todo ello, decidimos analizar el estado de actividad de la vía SWH en condiciones de sobreexpresión de aPKC-CA estudiando la expresión de sus genes diana *diap-1*, *ex*, *cycE* y *wg* (Figura R18). La activación de la vía de SWH y la

consiguiente retención de Yki fuera del núcleo impide la transcripción de estos genes por lo que su expresión indica que la vía de SWH se encuentra inactiva. Observamos que las regiones mutantes *aPKC-CA* presentan elevados niveles transcripcionales de *diap1-LacZ* y *ex-LacZ*, dos transgenes que reflejan la expresión de *diap1* y *ex* (Figura R18 A, B) y que los niveles de las proteínas Wg y CycE estaban aumentados en el territorio mutante *aPKC-CA* (Figura R18 C-D'). Estos resultados indican por tanto que la sobreexpresión de *aPKC-CA* inactiva la vía de SWH. No podemos asegurar que la cantidad de Yorkie nuclear aumente en el tejido mutante *aPKC-CA* porque los resultados obtenidos por tinción con un anticuerpo específico anti-Yki no tienen la definición suficiente para estimarlo (datos no mostrados).

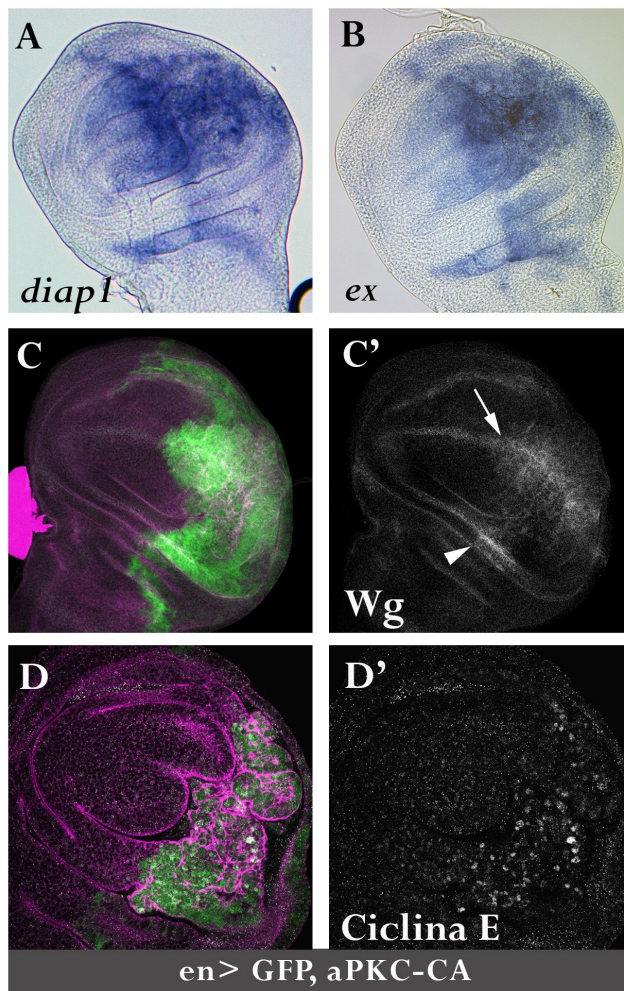


Figura R18. La sobreexpresión de *aPKC-CA* inhibe la vía de SWH. (A, B) La expresión de *diap1-lacZ* (A) y *ex-LacZ* (B), determinada por hibridación *in situ* utilizando una sonda de RNA complementaria al mRNA de *lacZ*, está incrementada en el compartimento P de los discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-aPKC-CA*. (C, C') Acumulación de las proteínas Wg (C, C') y Ciclina E (D, D) en discos *en-Gal4 UAS-GFP UAS-aPKC-CA*. Ambas proteínas son más abundantes en el compartimento P mutante (marcado en verde en C y D) que en el compartimento A control. Nótese el aumento en la expresión de *wg* en el borde D/V (C', flecha) y en el borde proximal de la región presuntiva de ala (C', punta de flecha).

RESULTADOS

R2.1.1 Análisis de epistasia entre aPKC y diversos componentes de la vía SWH

Para determinar en qué punto de la vía de SWH podría estar actuando aPKC llevamos a cabo un análisis de epistasia con diferentes componentes y reguladores de esta vía.

R2.1.2 Interacción de aPKC con *yki*

Grzeschik *et al.* (2010) determinaron que la sobreexpresión de *aPKC-CA* en la región postmitótica y en diferenciación del disco de ojo (controlada por la línea GMR-Gal4) ocasionaba un moderado incremento del tamaño del ojo adulto y propusieron que se debía a la inactivación de la vía de SWH ya que el tamaño del ojo disminuía en cierto grado en condiciones de heterocigosis para un mutante *yki*. Nos preguntamos si de modo similar podría haber una reversión del aumento de tamaño del disco de ala asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA disminuyendo los niveles Yki. Efectivamente, en condiciones de heterocigosis para *yki* (*yki*^{+/-}) se suavizó el fenotipo de sobrecrecimiento observado en los discos mutantes *en-Gal4 UAS-GFP UAS- aPKC-CA* (Figura R19). Mientras que un 70% de los discos de ala de larvas *en-Gal4 UAS-GFP /CyO wg-lacZ; UAS-aPKC^{CAAX wt}* crecidas a 21°C presentaban grandes sobrecrecimientos (n=20, Figura R19 A, A'), en los mutantes de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP /Yki^{MB09079}; UAS- aPKC-CA* el 56,5% de los discos presentaban un sobrecrecimiento más moderado (n=23, Figura R 19 B, B').

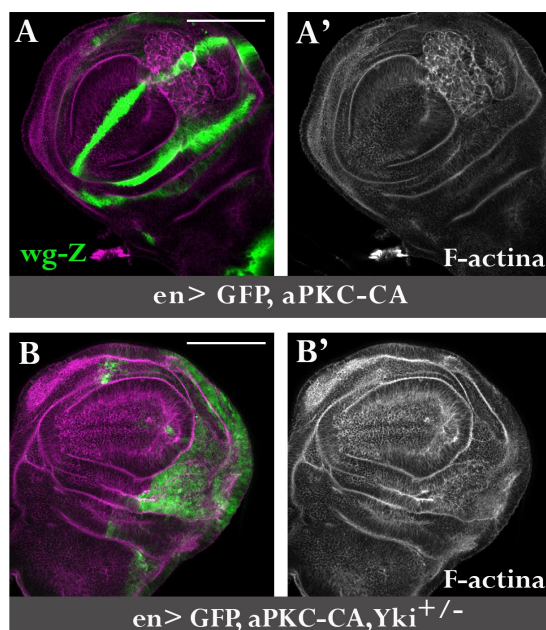


Figura R19. La heterocigosis para *yki* reduce el sobrecrecimiento de los discos que expresan aPKC-CA. Se cruzaron moscas *en-Gal4 UAS-GFP/CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA/ TM6b* con *w; Yki^{MB09079}/CyO wg-LacZ* y se mantuvieron los cruces a 21 °C. La expresión de *wg-lacZ* (determinada por tinción con anticuerpo anti-beta galactosidasa, verde en A) permite identificar los discos que no llevan la mutación *yki* (A, A'). (B, B') Disco de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP /Yki^{MB09079}; UAS- aPKC-CA*. Se muestran imágenes de los discos más representativos de cada genotipo teñidos con faloidina (magenta en A y B; blanco en A' y B'). El compartimento mutante está marcado en verde en B por la expresión de GFP.

Al reducir los niveles de Yki también se suavizaba el fenotipo observado en adultos. Así, el índice de supervivencia de los adultos que expresan aPKC-CA dirigido por *en*-Gal4 aumenta en condiciones de heterocigosis para *Yki* (Figura R20).

Las alas de las moscas *en>aPKC-CA* mantenidas a 21 °C presentan una amplia variedad de fenotipos que comprenden desde pérdida de las venas transversales o de pequeños regiones del tejido de ala hasta la ausencia de grandes territorios y necrosis generalizada. Agrupamos los fenotipos según su gravedad en 5 categorías tal y como se muestra en la figura R21. Al comparar la frecuencias de alas en las diferentes categorías en presencia de una o dos dosis de *yki*+ se observa una clara reversión del fenotipo. La frecuencia de alas más afectadas (tipos 5+6) baja de 42.9 % (en moscas *yki*+/+ que expresan *aPKC-CA*) al 27% (en condiciones heterocigóticas para *yki*). Estos resultados indican que se requiere Yki para el sobrecrecimiento de los discos mutantes *aPKC-CA*.

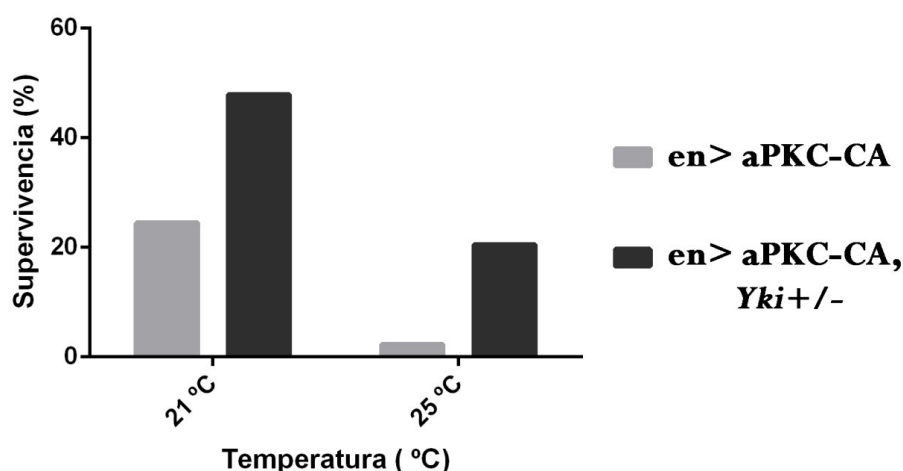


Figura R20. La supervivencia de los adultos que expresan aPKC-CA dirigido por *en*-Gal4 aumenta en condiciones de heterocigosis para *yki*. Tras mantener las puestas del cruce *en*-Gal4/CyO *tub*-G80, *UAS*-*DaPKC-CA* x *yki*^{MB09079}/If a 17°C durante el estadio embrionario, se pasaron las larvas a 21 o 25 °C para determinar la tasa de supervivencia en adultos. En el caso de *en*-Gal4 *UAS*-*DaPKC-CA* los valores de supervivencia obtenidos fueron del 24,5 % a 21 °C (N= 294) y del 2,3 % a 25 °C (N= 87). Al reducir la dosis de Yki la supervivencia ascendió al 47,9 % a 21°C (N= 263) y al 20,4 % a 25 °C (N= 88).

RESULTADOS

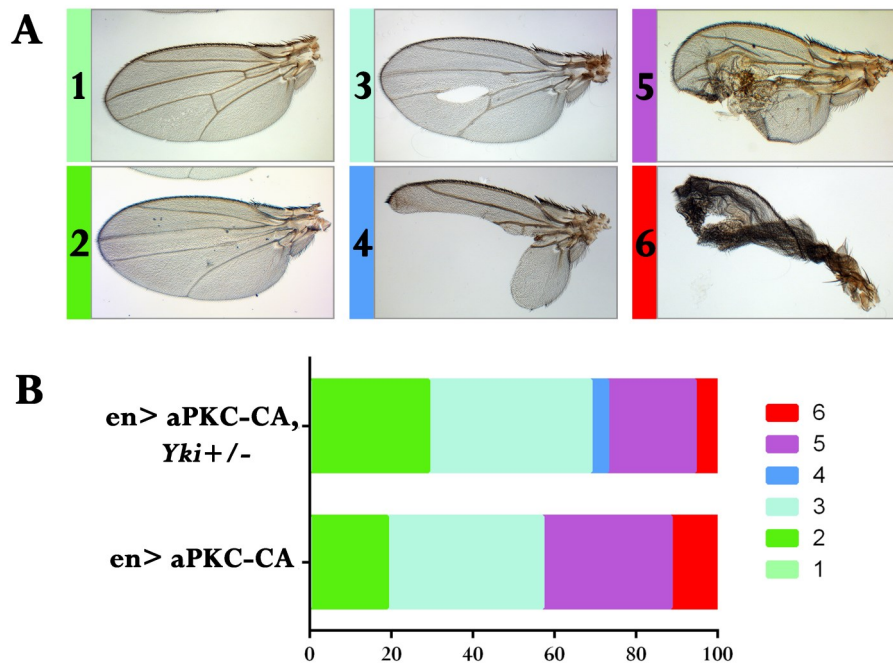
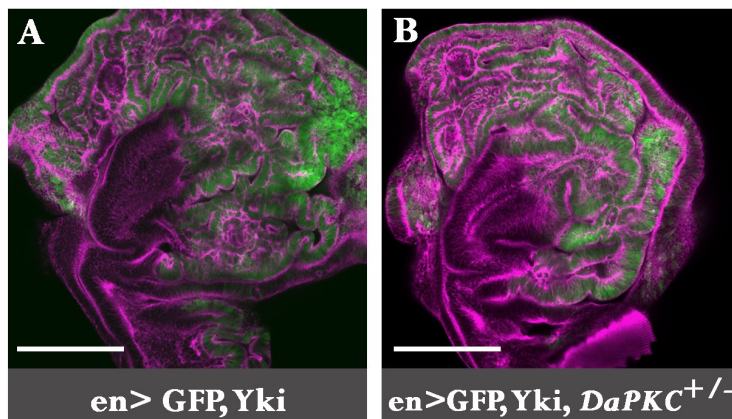


Figura R21. La heterocigosis para *yki* aumentan la supervivencia de los adultos que expresan aPKC-CA dirigida por *en*-Gal4 y suaviza la aparición de malformaciones en las alas en el adulto. (A) Clasificación de los fenotipos de ala. 1. Ala de tipo silvestre; 2. Leve, pérdida de las venas transversales; 3. Medio, pequeñas pérdidas de territorio; 4. Fuerte, pérdidas grandes de territorio sin necrosis; 5. Muy fuerte, pérdidas grandes de territorio y/o necrosis tisular; 6. General, necrosis generalizada o ausencia total del ala. (B) Distribución de las alas de moscas de genotipo *en*-Gal4 *UAS-aPKC-CA* y *en*-Gal4/*yki*; *UAS-aPKC-CA* en las diferentes clases fenotípicas. Los porcentajes por grupo de las moscas *en*-Gal4 *UAS-aPKC-CA* son: 0% (tipo 1); 18,9% (tipo 2); 38,1% (tipo 3); 0% (tipo 4); 31,4% (tipo 5) y 11,5% (tipo 6) (N=145). En el caso de las moscas *en*-Gal4/*yki*; *UAS-aPKC^{CAAX} wt* los porcentajes son: 0% (tipo 1); 29 % (tipo 2); 39,9% (tipo 3); 4,1 % (tipo 4); 21,4 % (tipo 5) y 5,6 % (tipo 6) (N=194). Se pueden encontrar alas de los tipos 2, 3, 5 y 6 tanto en las moscas de genotipo *en*-Gal4 *UAS-aPKC-CA* como en las moscas *en*-Gal4/*yki*; *UAS-aPKC-CA* pero las de la categoría 4 sólo se encontraron en condiciones de sobreexpresión de aPKC-CA y heterocigosis para *yorkie*.

Analizamos si, de modo recíproco, el crecimiento excesivo de los discos imaginales causado por la sobreexpresión de *yki* (Huang *et al.*, 2005) podría verse modificado al reducir la dosis de *DaPKC*. Sin embargo, la heterocigosis para un alelo nulo de *aPKC* (*DaPKC^{K06403}/+*) o la reducción de *aPKC* por expresión de *UAS-aPKC RNAi* no modificó el sobrecrecimiento asociado a la sobreexpresión de *yki* (Figura R22 y datos no mostrados). Por tanto en una jerarquía de actuación génica, diríamos que *aPKC* actúa por encima de *Yki*.

Figura R22. El crecimiento hiperplásico asociado a la sobreexpresión de Yki no se rescata en condiciones de heterocigosis para *DaPKC*. (A) Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP; UAS-yki* (A) y *en-Gal4 UAS-GFP/DaPKC^{K06403}; UAS-yki* (B). El compartimento P donde se sobreexpresa *yki* está marcado en verde por la expresión de GFP. Los discos están teñidos con faloidina (magenta). Barras de calibrado de 100 μ m.



R2.1.3. Interacción de *aPKC* con *hippo*

hippo codifica una de las quinasas que forma parte de la vía de SWH participando en la inactivación de Yki (Wu *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). La sobreexpresión de *hippo* en el compartimento P provoca la desaparición de este territorio (Figura R23B) al reprimir la actividad de Yki y provocar el aumento de la apoptosis y la disminución de la proliferación celular. Este fenotipo no se modifica al sobreexpresar conjuntamente *hippo* y *aPKC-CA* (Figura R23 C) lo que sugiere que *DaPKC* en la vía de SWH actúa genéticamente por encima de *hippo*.

R2.1.4 Interacción de *aPKC* con *capping protein A*

La implicación de la red de actina filamentosa de la región apical en la regulación de la vía de SWH se puso de manifiesto en los estudios de Fernandez *et al.*, (2011) y Sansores-Garcia *et al.*, (2011) donde se observaba que la acumulación de actina apical, debida a la falta de función de los genes *capping protein A* (*cpA*), *capping protein B*, *capulet* o por la sobreexpresión de *Diaphanous^{CAAX}*, causaban sobrecrecimientos asociados a la inhibición de la vía de SWH. Dado que en los discos mutantes para *aPKC-CA* aumentan considerablemente los niveles de la F-actina, cabía la posibilidad de que el sobrecrecimiento estuviera mediado por la vía de la actina. Sin embargo, la coexpresión de *UAS-aPKC-CA* con *UAS-cpA* (que por sí sola no produce efectos fenotípicos apreciables, Figura R23 D, D') no modificó el fenotipo de sobrecrecimiento de los discos *en-Gal4 UAS-aPKC-CA* ni el incremento en la acumulación de actina (Figura R23 E, E', comparar con A, A') sugiriendo que *aPKC-CA* actuaría por debajo de *cpa* en la regulación de la acumulación de actina y en el control de la vía de SWH.

RESULTADOS

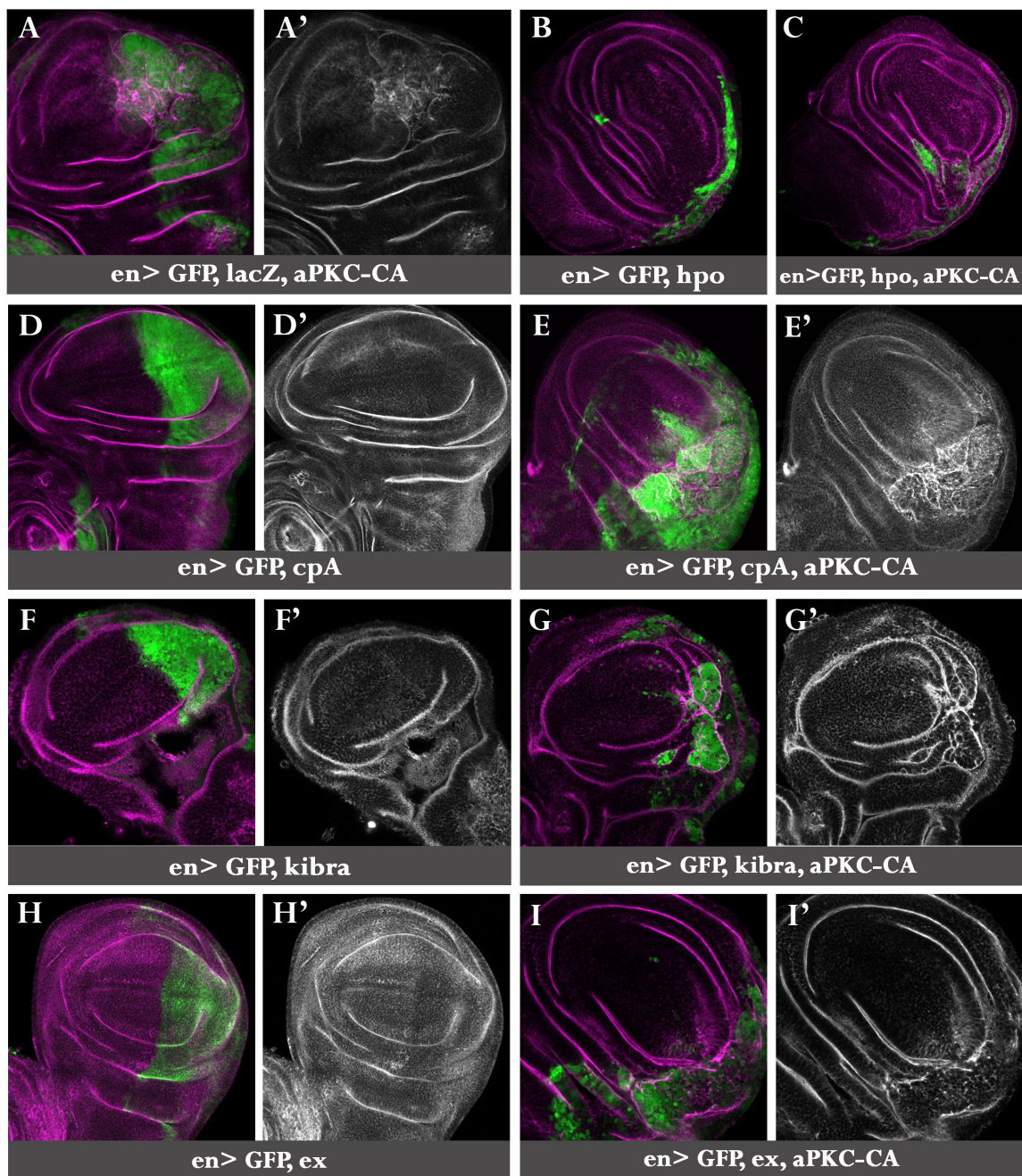


Figura R23. Análisis de las interacciones genéticas entre *aPKC* y varios componentes o reguladores de la vía de SWH. Las sobreexpresiones se realizaron a 21 °C bajo el control de la línea *en-Gal4 UAS-GFP*. (A-I') Discos imaginales de ala de los genotipos indicados teñidos con faloidina (magenta y blanco). En verde se muestra la extensión del compartimento mutante.

R2.1.5 Interacción de *aPKC* con *kibra*

Kibra es un regulador de la vía de SWH que, formando parte de un complejo proteico con Merlin y Ex, activa dicha vía (Baumgartner *et al.*, 2010; Genevet *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). Además, KIBRA está relacionado funcionalmente con aPKC (Yoshihama *et al.*, 2012). KIBRA posee un dominio aBR que interacciona físicamente con el dominio quinasa de aPKC, de un modo muy similar al dominio pseudosustrato de la propia aPKC y que actúa inhibiendo su función quinasa (Buther *et al.*, 2004; Yoshihama *et al.*, 2011). Por otro lado células epiteliales MDCK en cultivo mutantes *kibra* expanden su dominio apical, fenotipo parcialmente revertido empleando inhibidores químicos de PKC ζ (Yoshihama *et al.*, 2011). Nos preguntamos si la sobreexpresión de dKibra podría revertir el sobrecrecimiento asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA. Como se observa en la Figura R23 F, F', la sobreexpresión de Kibra por sí sola en el compartimento P reduce su tamaño (Baumgartner *et al.*, 2010) y en presencia de aPKC-CA causa la reducción de este compartimento (Figura R23 G, G'). De aquí podemos inferir que KIBRA puede reprimir a aPKC y que en la vía de SWH, aPKC actúa genéticamente por debajo de Kibra.

R2.1.6 Interacción de *aPKC* con *ex*

R2.1.6.1 La sobreexpresión de aPKC-CA reduce los niveles de Expanded y afecta a su localización subcelular

Expanded (Ex) es un regulador positivo de la vía de SWH que por un lado interviene en la fosforilación e inactivación de Yki por Warts (Hamaratoglu *et al.*, 2006) de un modo cooperativo junto a Merlin y Kibra (Baumgartner *et al.*, 2010; Genevet *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010) y por otro controla la actividad de Yki, mediante interacción directa proteína-proteína reclutándolo al dominio apical (Badouel *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2009).

RESULTADOS

Ex se localiza en la región apical de las células epiteliales (es decir, en el dominio de la membrana plasmática donde se encuentran aPKC y Crb, Figura R24 A) y su correcta localización asegura la funcionalidad de la vía SWH. Resultados previos indican que la localización subcelular y los niveles de Ex en el disco de ala dependen de la actividad del gen *crb*. Así en mutantes de falta de función de *crb*, Ex deja de localizarse en el dominio apical para encontrarse disperso en el citoplasma. Por otro lado, la sobreexpresión del dominio intracelular de Crb (Crb-intra) causa la eliminación de Ex. En ambos casos, la vía de SWH se inactiva y el disco de ala sobrecrece (Chen *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014).

Dada la estrecha relación física y funcional entre aPKC y Crb (Sotillos *et al.*, 2004) nos preguntamos si la expresión de *aPKC-CA* podría modificar la localización subcelular y/o los niveles de Ex. Observamos que los niveles de Ex en la membrana apical disminuían y su localización se hacía más difusa conforme aumentaba el tiempo de exposición de las células a *aPKC-CA* (Figura R24, B, C). Estos efectos dependen de la actividad quinasas de aPKC y no de posibles funciones estructurales de aPKC ya que la sobreexpresión de la proteína mutante *aPKC-DN* no los causa (Figura R24 D).

Como los niveles transcripcionales de *expanded* (medidos por la expresión de *ex-LacZ*) están aumentados en discos *en-Gal4*, UAS- *aPKC-CA* (Figura R18 B) estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *aPKC-CA* regula a Ex a nivel post-transcripcional. Al contrario que en el disco de ala, se ha descrito que la sobreexpresión de *aPKC-CA* en el disco de ojo controlada por la línea *GMR-Gal4* no altera la localización de Ex (Grzeschik *et al.*, 2010), lo que sugiere que el efecto de aPKC sobre Ex es específico de tejido.

Realizamos el experimento complementario, es decir, analizamos si la sobreexpresión de *ex* en discos *en> aPKC-CA* podría revertir su fenotipo. El sobrecrecimiento de los discos de ala mutantes *aPKC-CA* se reduce en parte al suplementar Ex de modo exógeno, indicando que la cantidad de Ex era limitante en los discos *aPKC-CA* (Figura R23 H-I').

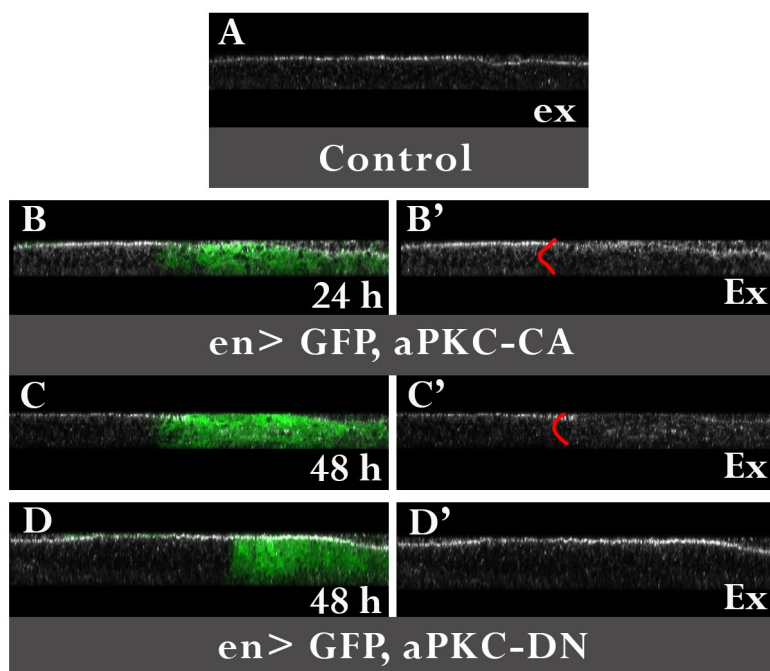


Figura R24. La sobreexpresión de aPKC-CA altera la localización subcelular de Expanded. Se muestran cortes sagitales de discos de ala teñidos con anticuerpo anti-Ex. (A) Localización de Ex en un disco de ala de tipo silvestre en la región subapical. (B- C') Discos mutantes *en-Gal4 UAS-aPKC-CA* teñidos con anti-Ex después de 24 o 48 horas de sobreexpresión de aPKC-CA a 25 °C. Ex se deslocaliza y baja de niveles progresivamente en el compartimento posterior mutante (marcado por la expresión de GFP, su límite anterior se señala por la línea roja en B' y C'). (D, D') La localización de Ex no se altera al sobreexpresar *UAS-aPKC-DN*.

R2.1.6.2 Expanded como posible diana de fosforilación de aPKC.

Nuestros resultados indican por tanto que la sobreexpresión de aPKC-CA causa la bajada de niveles y la deslocalización de Ex; y la inactivación de la vía de SWH en el disco de ala. Previamente Chen *et al.*, (2010); Ling *et al.*, (2010) y Robinson *et al.*, (2010) habían demostrado que la sobreexpresión del dominio intracelular de Crb (Crb intra) o su falta de función afectan a la localización y niveles de Ex; y que Crb, mediante su dominio FERM, recluta a Ex a la membrana apical, donde es fosforilado por una quinasa desconocida por el momento. En experimentos realizados *in vitro* en cultivos de células de *Drosophila* S2R+ se vio cómo la localización en la membrana de Ex dependiente de Crb favorece esta fosforilación (Ling *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014). Dada la interacción física de Crb y aPKC (Sotillos *et al.*, 2004), nos preguntamos si Ex unido a Crb sería un sustrato de fosforilación por aPKC. De hecho, el programa de predicción de fosforilación de proteínas Net phosk 1.0 sugería que Ex podría ser fosforilado por la familia de proteínas PKCs (Anexo 3).

RESULTADOS

Para responder a esta pregunta obtuvimos del Dr. D.J. Pan dos plásmidos que permiten la expresión de Expanded-V5 y Expanded-V5-miristoilado y dirigido a membrana (Ling *et al.*, 2010). Según describieron estos autores, cuando Expanded se localiza en la membrana plasmática (ya sea por unión a Crb o por una señal de miristoilación) se fosforila, visualizándose una menor movilidad electroforética frente a la de esta misma proteína en ausencia de Crb-intra, desprovista de una señal de miristoilación o después del tratamiento con la fosfatasa CIP (Ling *et al.*, 2010). Si la fosforilación de Ex dependiera de aPKC, inhibiendo esta quinasas, la banda proteica correspondiente a Expanded podría experimentar un cambio en su movilidad electroforética similar al obtenido por tratamiento con la fosfatasa CIP. Comprobamos que aPKC se encuentra activa en células S2R+ mediante tinción de Western blots con el anticuerpo anti p-T555 aPKC (Figura R25 A) y que Expanded-V5-miristoilado presenta una movilidad electroforética ligeramente menor que Expanded-V5 y sensible al tratamiento con CIP (Figura R25 B) lo que indica su estado fosforilado. Sin embargo, dicha fosforilación no parece depender de aPKC ya que la movilidad electroforética de Expanded-V5-miristoilado no se modifica por el tratamiento de las células con el inhibidor de PKCs *chelerytrine* (Figura R25 B).

Por tanto estos resultados sugieren que aPKC no es la enzima que fosforila a Ex en el dominio apical de la membrana.

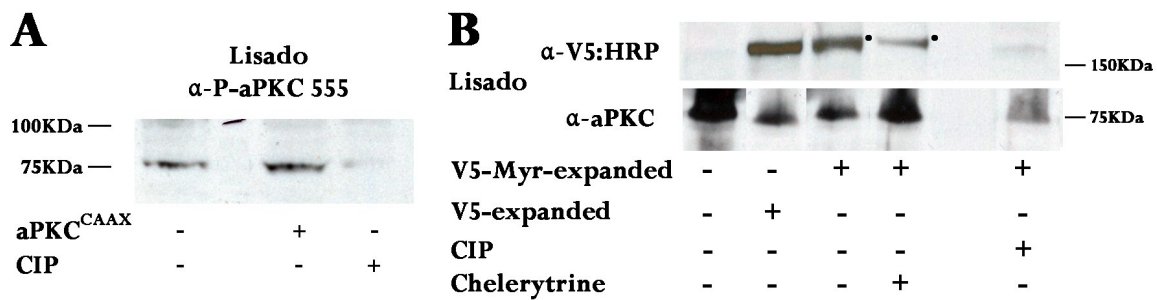
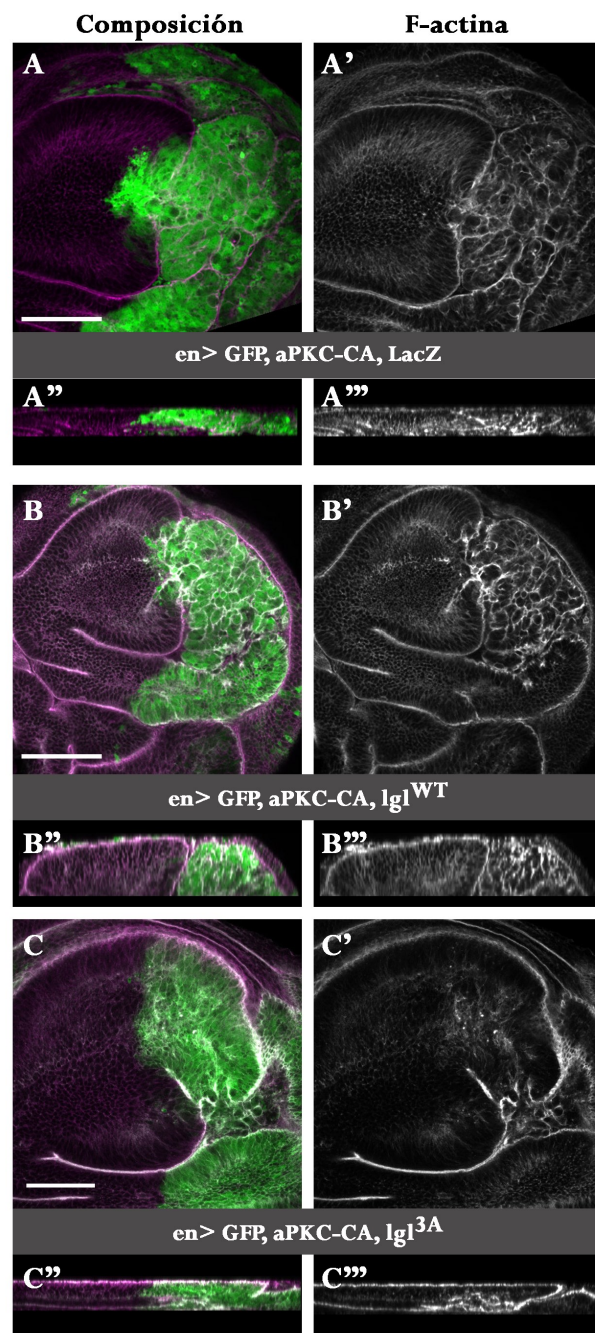


Figura R25. aPKC no parece ser la quinasas responsable de la fosforilación de Ex (A) Las células S2R+ presentan aPKC fosforilada y por tanto activa. Western blots de proteínas procedentes de extractos de células S2R+ incubados con el anticuerpo anti-pT555 aPKC. Se observa una banda de p-aPKC cuya intensidad disminuye por el tratamiento con la fosfatasa CIP. La transfección con pAc-aPKC^{CAAX} se empleó como control positivo. (B) Western blot de proteínas procedentes de extractos de células S2R+ transfectadas con las plásmidos de expresión que se indican, tratadas o no con CIP o Chelerytrine e incubados con anti-V5-HRP o anti-aPKC. El punto indica la proteína Ex fosforilada. El gran tamaño de la proteína Ex (160 kD) es probablemente la causa del pequeño cambio de movilidad electroforética asociado a su fosforilación.

R2.1.7 aPKC-CA puede reprimir la vía de SWH al inhibir la actividad de Lgl

La fosforilación de Lgl por aPKC desplaza a esta proteína de la membrana inactivándola (Betschinger *et al.*, 2003). Dado que la falta de función de *lgl* en el disco de ojo (o en el de ala en combinación con Ras^{V12}) causa la inactivación de la vía de SWH (Grzeschik *et al.*, 2010; Menendez *et al.*, 2010), nos preguntamos si la inhibición de Lgl por aPKC-CA podría ser uno de los factores que contribuyeran a la inactivación de la vía de SWH en condiciones de sobreexpresión de aPKC-CA. Para investigar esta cuestión co-expresamos en los discos de sobreexpresión de aPKC-CA. Para investigar esta cuestión co-expresamos en los discos de ala *aPKC-CA* y *lgl* de tipo silvestre o *lgl-3A* (que codifica una proteína Lgl mutante no fosforilable por aPKC (Betschinger *et al.*, 2003). Como se observa en la Figura R26 la presencia de niveles elevados de Lgl3A, insensible a aPKC-CA, pero no de Lgl de tipo silvestre, que sería inactivada por la quinasa, causa una apreciable recuperación del sobrecrecimiento de los discos que expresan aPKC-CA.

Figura R26. La sobreexpresión de Lgl no fosforilable por aPKC rescata en parte el sobrecrecimiento de los discos que expresan aPKC-CA. Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-aPKC-CA UAS-LacZ* (A-A''), *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-aPKC-CA; UAS-lgl-wt* (B-B'') y *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-aPKC-CA ; UAS- lgl-3A* (C-C'') teñidos con faloidina (magenta y blanco). En las secciones sagitales mostradas en A'', A''', B'',B''',C'' y C''' se observa claramente el menor tamaño del compartimento posterior (que está menos replegado, se marca por GFP) al co-expresar aPKC-CA con *lgl-3A* que al coexpresarla con *lgl* de tipo silvestre o en el control. Barras de calibrado de 50 μ m.



RESULTADOS

R2.2 aPKC-CA activa la vía de JNK

La ruta de la JNK (acrónimo de su nombre en inglés *c-Jun N-terminal Kinase*) consiste en una cascada de quinasas que, entre otras funciones, regula la maquinaria apoptótica, la proliferación y la migración celular (Igaki, 2009; Bogoyevitch *et al.*, 2010). Esta vía contribuye al crecimiento e invasión de tumores asociados a alteraciones de la polaridad apicobasal (Igaki *et al.*, 2006; Uhlirova y Bohmann, 2006). Por ello examinamos el estado de actividad de la vía de JNK en condiciones de sobreexpresión de *aPKC-CA*. El gen *puckered* (*puc*), que codifica una fosfatasa que regula negativamente la vía de JNK, es una diana transcripcional de esta vía (McEwen y Peifer, 2005), por tanto la expresión de la línea *puc-LacZ* refleja la activación de la vía JNK. En discos de ala control *puc-lacZ* se expresa sólo en la región del tallo (Martin-Blanco *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2005), como muestra la punta de flecha en el recuadro de la figura R27 A". Observamos expresión ectópica de *puc-LacZ* en las células que sobreexpresan *aPKC-CA* tanto cuando la expresión se dirige a grandes regiones del disco (por ejemplo con *en-Gal4*, Figura R27 A-A'') como cuando se activa en clones de células (Figura R27 B, B') lo que sugiere la activación de la vía de JNK por *aPKC-CA*.

JNK podría mediar la apoptosis de las células que expresan *aPKC-CA* (de manera análoga a como lo hace en el caso de clones *lgl*, *scrib* o *dlg* (Brumby y Richardson, 2003; Igaki *et al.*, 2006; Frolidi *et al.*, 2010; Menendez *et al.*, 2010) y/o contribuir a aumento del ritmo de proliferación de estas células. Si su función principal fuera la inducción de la apoptosis, al bloquear la vía de JNK esperaríamos un aumento en el tamaño de las regiones que expresan *aPKC-CA*. Sin embargo bloqueando la vía de la JNK por la expresión de RNA interferente de *basket* -que codifica la JNK en *Drosophila* (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996)- observamos la reversión parcial del fenotipo de sobrecrecimiento asociado a la sobreexpresión de *aPKC-CA* (Figura R27 D, D''') lo que sugiere que en el contexto celular de sobreexpresión de *aPKC-CA*, JNK interviene fundamentalmente en la activación de la proliferación celular.

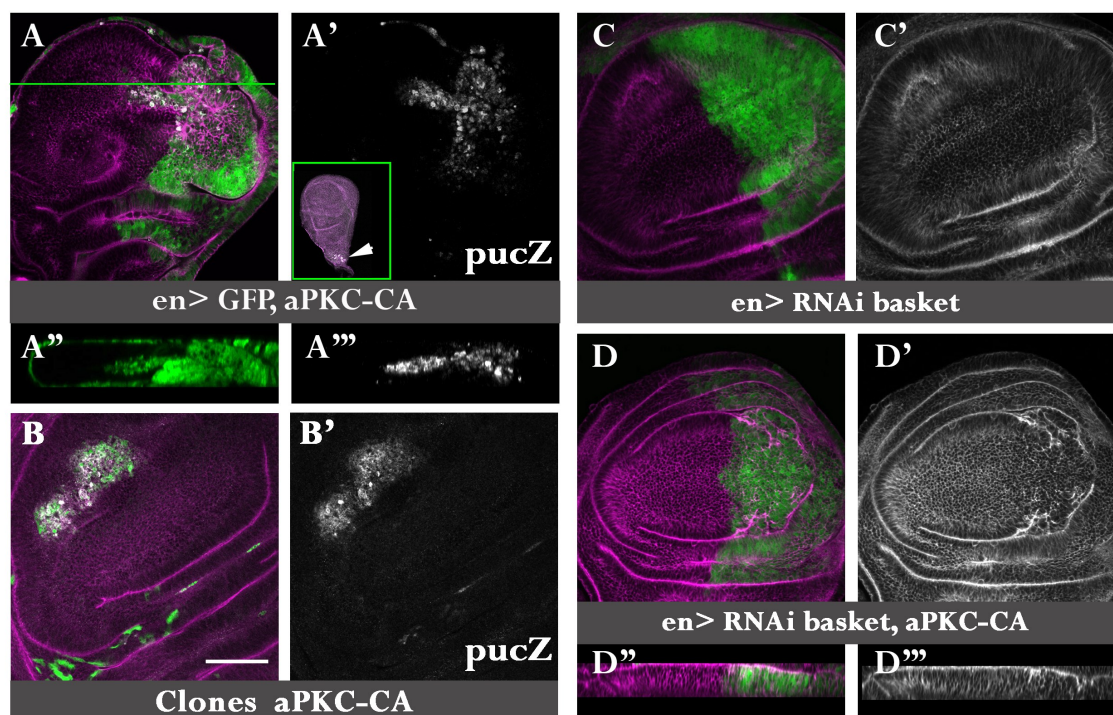


Figura R27. La activación de la vía de JNK media en parte los efectos fenotípicos de la sobreexpresión de aPKC-CA (A-A'') Expresión ectópica de *puc-LacZ*, determinada por tinción con anticuerpo anti- β galactosidasa (mostrada en blanco) en discos *en-Gal4*, *UAS-GFP* *UAS-DaPKC-CA*. La expresión de *puc-LacZ* en discos control, que sólo se observa en la región proximal del disco (punta de flecha), se muestra insertada en la figura A'. (B, B') La vía de la JNK está activa en los clones de células mutantes *aPKC-CA* (marcados en verde por la expresión de GFP). (C-D'') La disminución en la actividad de la vía de JNK mediante la expresión de UAS-RNAi *basket* no produce efecto fenotípico apreciable por sí sola (C, C') pero suaviza el fenotipo de sobrecrecimiento de los discos de ala que expresan UAS-aPKC-CA dirigido por *en-Gal4* (D-D'') (comparar por ej. con la Figura R26 A). La extensión del territorio mutante se muestra en verde (expresión de GFP). Los discos están teñidos también con faloidina (en magenta).

R2.3 aPKC-CA activa la vía de Notch

La vía de Notch está implicada -en condiciones fisiológicas- en el mantenimiento de las células madre, la especificación de destinos celulares, el control de la proliferación o apoptosis durante la embriogénesis y en la homeostasis de los tejidos del adulto (Artavanis-Tsakonas, 1988; Lobry *et al.*, 2011). Asimismo su desregulación parece desempeñar un papel importante en leucemias y otras alteraciones oncogénicas en tejido hematopoyético y también en tumores sólidos, modulando entre otros procesos la proliferación, adhesión celular, transición epitelio-mesénquima o la angiogénesis (Leong y Karsan, 2006). Notch se

RESULTADOS

considera un oncogén aunque otras evidencias experimentales indican que puede actuar como supresor de tumores según el contexto celular (revisado en Ntziachristos *et al.*, 2014).

La vía de Notch se activa por la unión ligando-receptor (ambos proteínas transmembrana) entre células adyacentes. Esta unión provoca una rotura proteolítica de Notch, cuyo fragmento terminal citoplasmático (N-intra) se traslada al núcleo. Allí, uniéndose a un complejo proteico formado entre otras proteínas por Suppressor of Hairless (Su(H)) y Mastermind (Mam) activa la transcripción de sus genes diana (Artavanis-Tsakonas, 1988).

La sobreexpresión de N-intra en el dominio de ala del disco imaginal genera grandes sobrecrecimientos (Go *et al.*, 1998; Baonza y Garcia-Bellido, 2000; Giraldez y Cohen, 2003)(Figura S5). Por otro lado, datos no publicados de nuestro laboratorio (Learte *et al.*, en preparación) indican que esta vía es muy sensible a los cambios de actividad de aPKC. Por ello nos preguntamos si aPKC-CA podría activar la vía de Notch causando por tanto los sobrecrecimientos observados en los discos mutantes para *aPKC-CA*. Efectivamente genes diana de la ruta Notch como *E(spl)mβ* o *cut* aumentan su transcripción en la región mutante para aPKC-CA, lo que es indicativo de la hiperactivación de la vía de Notch (Figuras R28 A-B'' y S6 A-B'). Examinamos si inhibiendo la vía de Notch podríamos revertir el fenotipo de sobreexpresión de aPKC-CA. Para ello empleamos una forma dominante negativa de *mam* (*mam^{DN}*, (Wu *et al.*, 2000; Kovall, 2007)). Comprobamos que la sobreexpresión de *mam^{DN}* inhibía la vía de Notch, tanto cuando se expresaba de modo aislado o junto a aPKC-CA ya que *E(spl)mβ* o *cut* no se transcribían en el dominio de expresión de *mam^{DN}* (Figuras R28 C-D'' y S6 C-D'). Sin embargo, en general no se observa que la co-expresión de *mam^{DN}* con aPKC-CA cause una reversión ni del sobrecrecimiento ni de la desorganización epitelial asociados a la sobreexpresión de aPKC-CA (Figuras R28 D-D'' y S6 D, D').

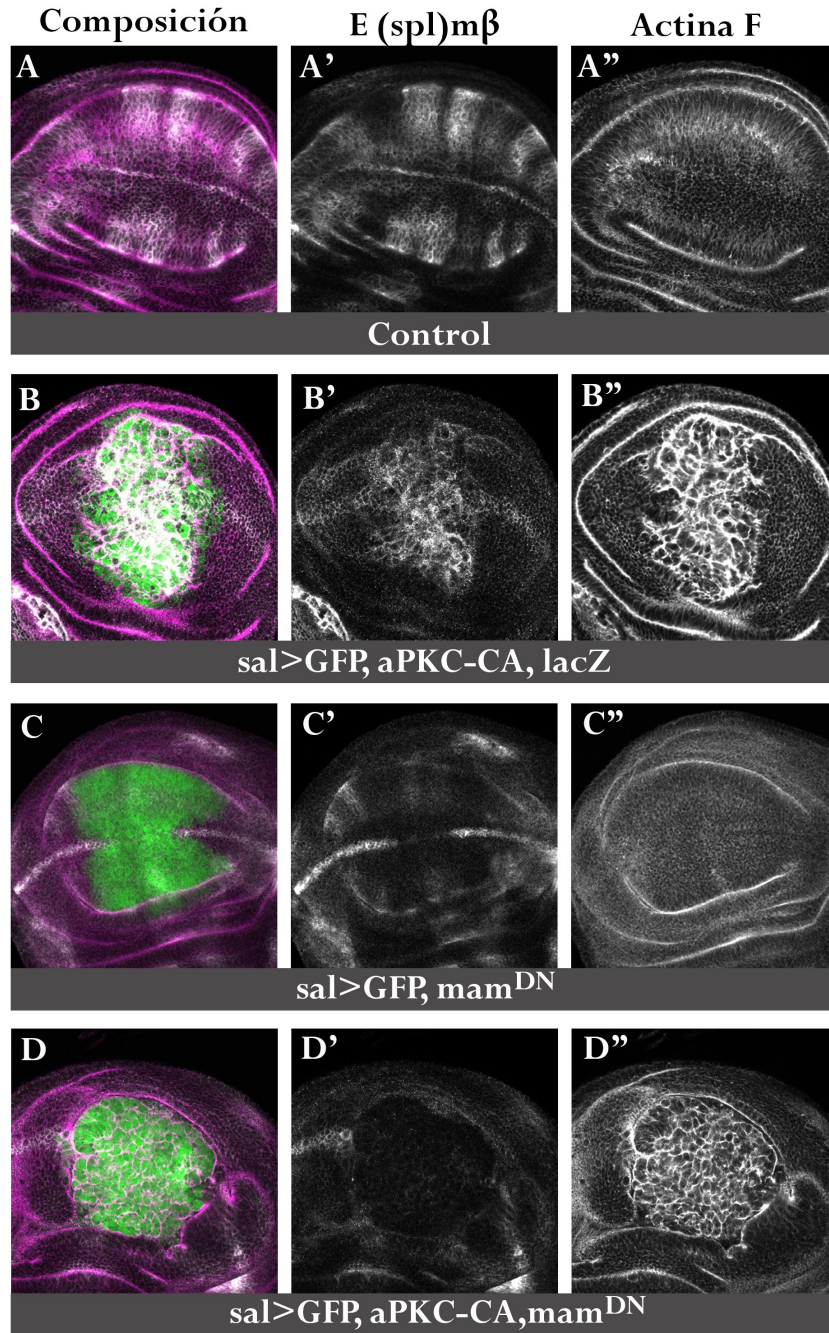


Figura R28. aPKC-CA activa la vía de Notch pero el bloqueo de esta vía no rescata el fenotipo asociado a la sobreexpresión de aPKC-CA. Discos de ala de los genotipos indicados teñidos con un anticuerpo anti-CD2 para determinar la expresión de E(spl)m β -CD2 (en blanco) y con faloidina (en magenta y blanco). (A') Patrón de expresión de E(spl)m β -en un disco control. (B-B'') En los discos que expresan aPKC-CA en el dominio *sal* (marcado en verde, B) aumentan los niveles de E(spl)m β -CD2 (B') y actina (B''). (C-C'') La expresión de mam^{DN} hace que disminuya fuertemente la transcripción de E(spl)m β -CD2 (C') en el territorio mutante (marcado en verde, C) pero no afecta al citoesqueleto de actina ni modifica el tamaño del disco (C''). (D-D'') Discos de larvas de genotipo *sal-Gal4 / UAS-aPKC-CA ; UAS-mam^{DN} / UAS-GFP*. La expresión de E(spl)m β -CD2 se bloquea en el territorio mutante (D'), pero se mantienen la modificación en los niveles de actina y la desorganización y el aumento del tamaño del disco (D'').

RESULTADOS

R3. Análisis de la falta de función de aPKC en el disco imaginal de ala.

Como hemos descrito en apartados anteriores, el incremento en la proliferación celular, la inducción de apoptosis y la distorsión de la arquitectura tisular y el aumento del tamaño de los discos imaginales a consecuencia de la sobreexpresión de aPKC-CA parecen deberse, al menos en parte, a la inactivación de la vía de SWH y a la activación de la vía de JNK por la acción de esta quinasa. Para complementar estos resultados y entender la mejor la función de la proteína aPKC analizamos las consecuencias de su falta de función.

R3.1 aPKC se requiere para la viabilidad de las células de los discos imaginales

En primer lugar intentamos generar clones de falta de función para DaPKC por el sistema FLP/FRT de recombinación mitótica (ver Materiales y Métodos M 1.2.3.1) usando el alelo nulo de aPKC *DaPKC^{K06403}*. En ningún caso obtuvimos clones de células homocigóticas para *DaPKC^{K06403}* pero sí sus correspondientes clones gemelos (Figura R29 A-B''), lo que indica que las células carentes de aPKC no son viables.

aPKC es esencial para la supervivencia celular en el embrión de *Drosophila*, probablemente dada su implicación en la polaridad celular apicobasal (Wodarz *et al.*, 2000). Por otro lado, en células de mamíferos la inhibición de aPKC activa la apoptosis (Diaz-Meco *et al.*, 1996). Por ello analizamos, mediante la generación de clones MARCM (ver Materiales y Métodos M 1.2.3.3), si el bloqueo de la apoptosis por la sobreexpresión de la proteína inhibidora de la ruta apoptótica Diap1 podría permitir el crecimiento de los clones *aPKC*. Como se observa en la figura R29 C-C'', este no es el caso, ya que no se generan más que los clones gemelos.

Por otro lado, tratamos de conferir una ventaja competitiva a las células *DaPKC* aumentando en ellas la dosis de dMyc (Moreno y Basler, 2004). En estas condiciones tampoco logramos obtener clones DaPKC, pero sí sus respectivos clones gemelos (Figura R29 D-D''). Sí se obtuvieron clones de falta de función de *DaPKC*, pequeños y muy poco frecuentes, utilizando la técnica Minute (Morata y Ripoll, 1975) en experimentos realizados en el laboratorio por Anabel Rodríguez-Learte (datos no mostrados).

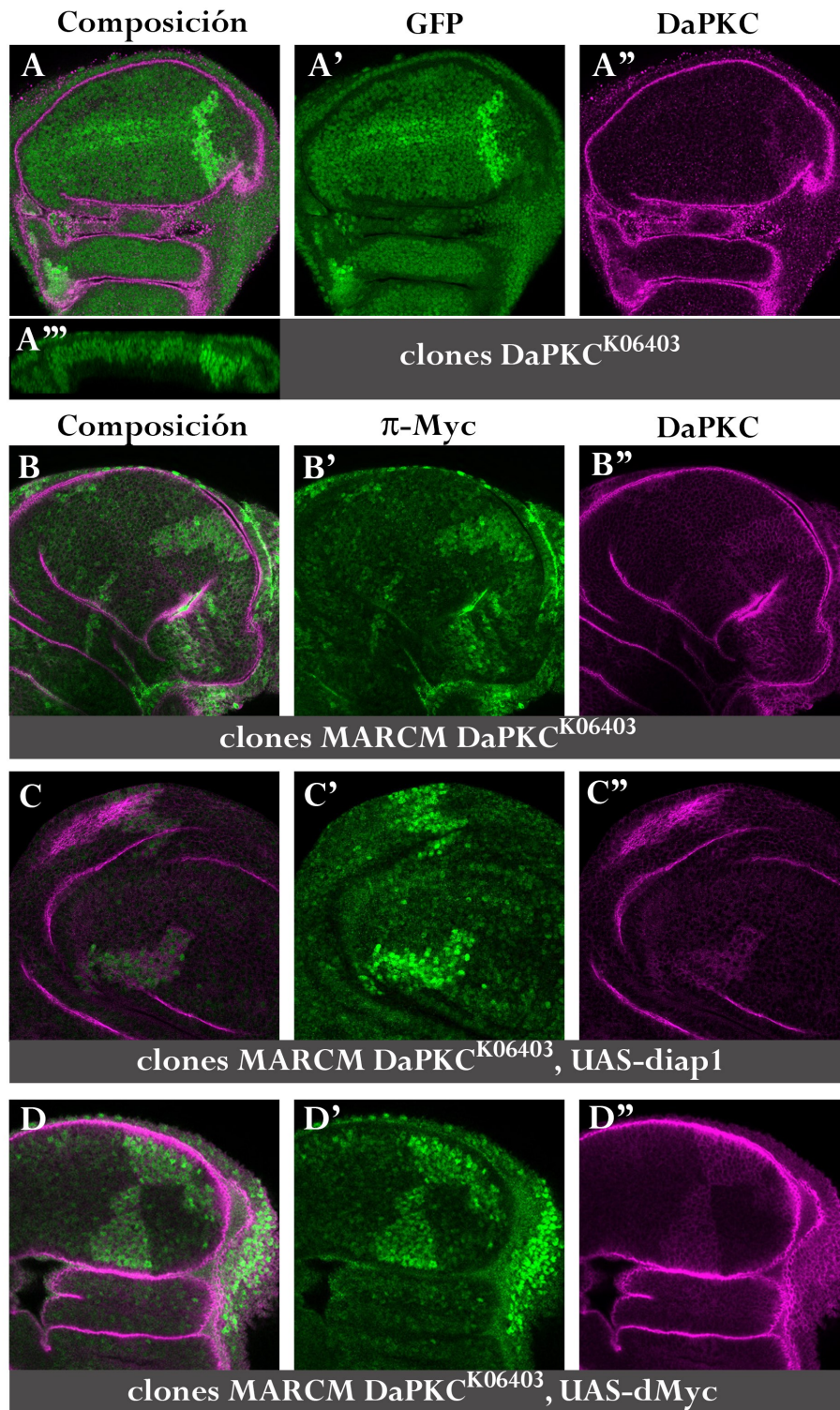


Figura R29. Los clones de células carentes de DaPKC son inviables. (A-B'') Se indujo la generación de clones a las 48-72 horas tras la puesta. No se observan clones de células *DaPKC*, que estarían marcados por falta de GFP (verde, A'), Myc (verde, B') o aPKC (magenta, A'', B''), pero sí la presencia de sus clones gemelos (con doble dosis de GFP, A, A', Myc, B, B', y de aPKC, A'', B''). (A''') Corte sagital donde tampoco se aprecian clones *DaPKC*. (C-C'') La inhibición de la muerte celular por sobreexpresión de *Diap1* no incrementa la viabilidad de los clones *DaPKC*. Se observan los clones gemelos (con doble dosis de Myc, C', y de aPKC, C''). (D-D'') La sobreexpresión de *dmyc* en las células mutantes para *aPKC* no aumenta su viabilidad.

RESULTADOS

Ensayamos si la viabilidad de las células nulas para *aPKC* dependía del entorno en el que se encuentran generando discos de ojo en el que la mayoría de las células eran mutantes nulas para *aPKC*. En larvas del genotipo *FRT42D GMR-hid l(2)CL-R[1]/ FRT42D DaPKC^{K06403}; ey-Gal4 UAS-FLP*, *ey-Gal4* induce la expresión de *FLP*, y por tanto la generación de clones, en todo el territorio del disco de ojo y la presencia de *GMR-hid l(2)CL-R[1]* elimina los clones gemelos. Aun así, como se observa en la Figura R30 B la falta de *aPKC* impide el desarrollo del ojo. Comprobamos que se debía a la falta de *aPKC* y no a alguna otra mutación asociada al cromosoma *FRT42D DaPKC^{K06403}* porque si se expresaba de modo exógeno *aPKC* (en larvas del genotipo *FRT42D GMR-hid l(2)CL-R[1]/ FRT42D DaPKC^{K06403}; ey-Gal4 UAS-FLP / UAS-aPKC*) se recuperaba en gran parte el desarrollo del ojo adulto (Figura R30 C). Por el contrario, prevenir la apoptosis por coexpresión de *p35* o *Diap-1* no permitía la recuperación del desarrollo del ojo (Figura R30 D y datos no mostrados).

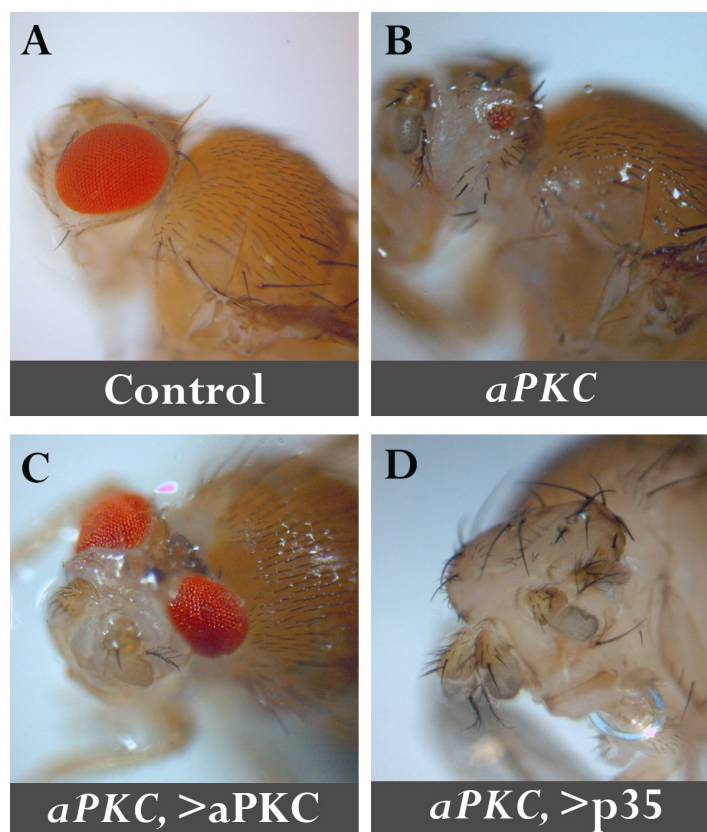


Figura R30.- La falta de *aPKC* impide el desarrollo del ojo. (A) Mosca adulta de tipo silvestre. (B) Mosca cuyos discos de ojo eran mutantes para *aPKC*. (C) Reversión parcial de la falta de ojo por expresión de *UAS-aPKC-wt* en discos de ojo mutantes nulos para *aPKC*. (D) El desarrollo de los ojos mutante para *aPKC* no se recupera al impedir la muerte celular por expresión de *UAS-p35*. Los diferentes genotipos se indican en el texto.

Dado que la ausencia total de aPKC es letal para las células epiteliales de los discos imaginales, empleamos la línea *UAS-RNAi DaPKC*, generada por Sol Sotillos, para analizar las consecuencias de la disminución de niveles de aPKC (Figuras R31 y S7). El efecto fenotípico depende de los niveles remanentes de aPKC en el disco de ala (que dependen a su vez de la línea *UAS-RNAi DaPKC* empleada y de la temperatura de desarrollo de las larvas). Observamos que cuando queda una cantidad de aPKC detectable por inmunohistoquímica, aunque mucho más reducida que en el control, los discos de ala no presentan grandes alteraciones (Figura S7). En condiciones más extremas de pérdida de aPKC (Figuras R31 A', B') la estructura tisular se ve muy afectada (Figura R31 A''). La bajada de los niveles de DaPKC causa muerte celular de un modo autónomo (Figura R31 B'') y en consecuencia se desarrollan alas carentes del territorio mutante (Fig. R31 C, D).

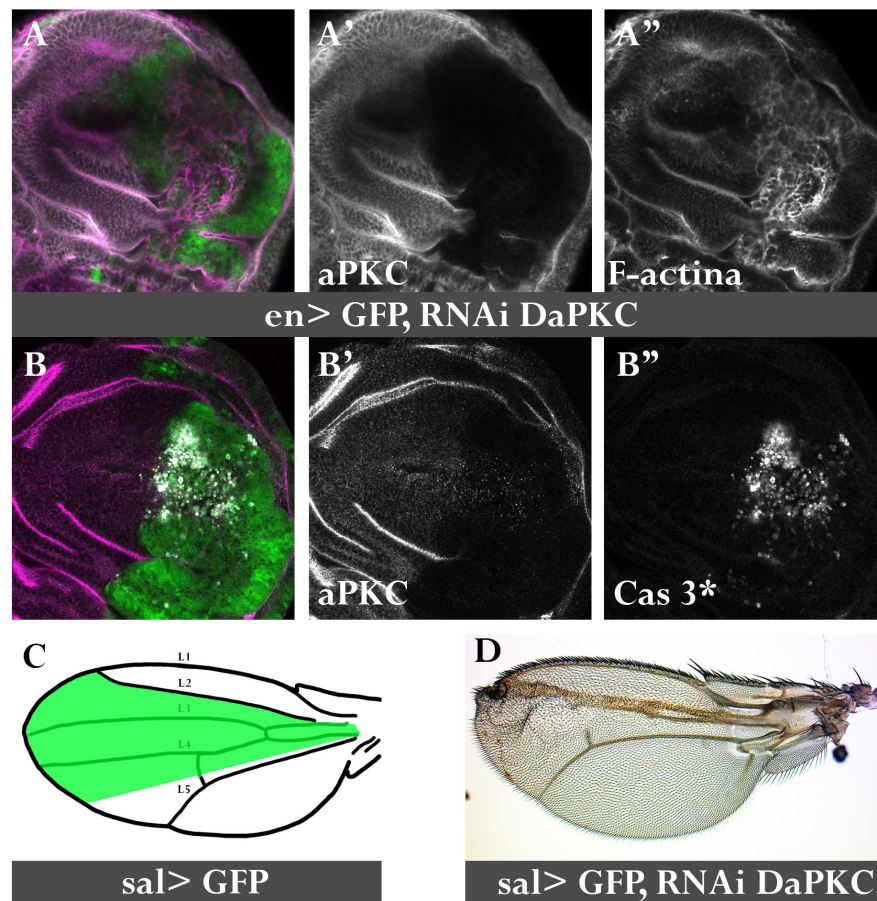


Figura R31. La reducción drástica en los niveles de aPKC causa muerte celular y altera el citoesqueleto de actina (A-B'') Discos de ala que expresan *UAS-RNAi aPKC* dirigido por *en-Gal4 UAS-GFP*, teñidos con faloidina (magenta en A, B, blanco en A''), anti-aPKC (A', B') o anti-caspasa 3 activa (B''). (C, D) Alas de los genotipos indicados. La extensión del dominio de expresión de *sal-Gal4* se muestra en verde sobre la imagen de un ala *sal-Gal4 UAS-GFP*.

RESULTADOS

Las observaciones previas sugieren que territorios con bajos o nulos niveles de aPKC activan mecanismos autónomos de muerte celular. De hecho, las células mutantes *aPKC* (por ejemplo por sobreexpresión de UAS-RNAi aPKC en la región *dpp* del disco de ala (Figura R32 A-A'')) tienden a extrudirse basalmente expresando la metaloproteasa *mmp1* (Figura R32 A''').).

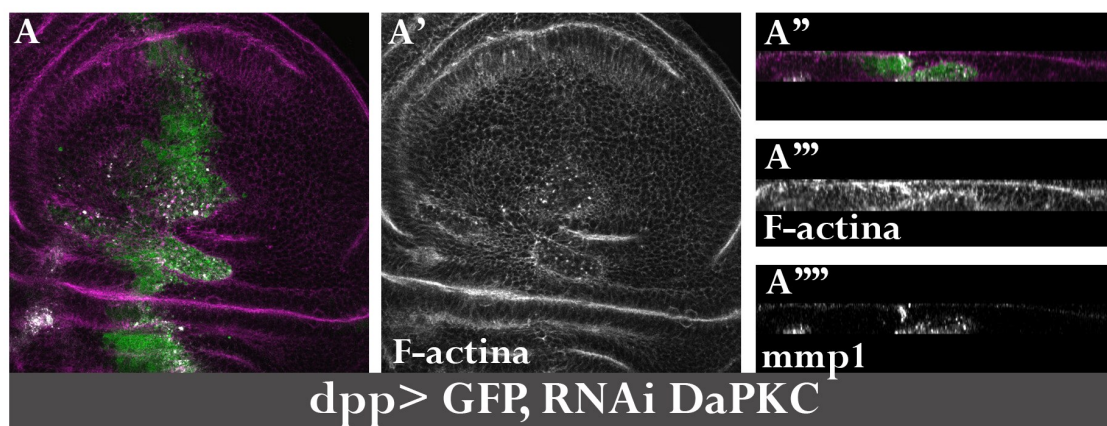


Figura R32. La pérdida de aPKC altera la estructura del epitelio del disco imaginal de ala (A-A''') Disco de ala que expresa *UAS-RNAi aPKC* en el dominio *dpp* (genotipo *dpp-Gal4 UAS-GFP UAS-RNAi aPKC*) teñido con faloidina y con anticuerpo anti-*mmp1*. La integridad del territorio *dpp* (mostrado en verde en A y A') se altera (A-A'', comparar con las figuras R4 C o R12 C), las células mutantes aparecen en la parte basal del epitelio (A''), acumulan actina (A', A''') y presentan niveles elevados de la metaloproteasa *mmp1* (A''').

R3.2 Polaridad apicobasal de las células del disco de ala mutantes para *aPKC*.

Al examinar la polaridad apicobasal de células con niveles indetectables de aPKC (por expresión de UAS-RNAi aPKC (Figura R33 A')) observamos que presentaban niveles muy reducidos de Crb en la membrana apical (Figura R33 B'') y alteraciones en el citoesqueleto de actina (Figura R33 B'''). Sin embargo la localización de Dlg no parece verse afectada en estos mutantes (Figura R33 A'').

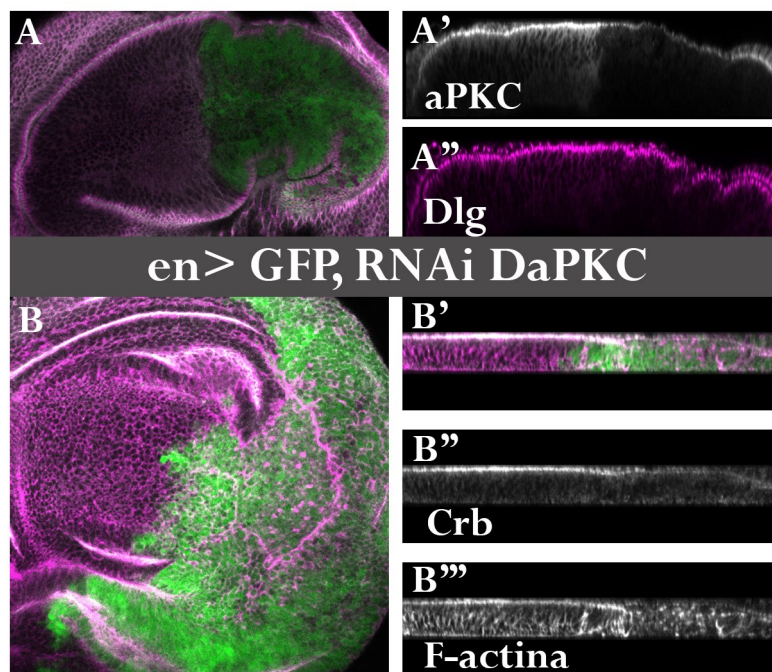


Figura R33. Crb se deslocaliza al disminuir los niveles de aPKC. (A-B'') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-RNAi aPKC* mostrando la distribución de aPKC (A'), Dlg (A, A''), Crb (B'') y F-actina (B, B', B''). El compartimento mutante se muestra en verde en A, B y B'.

R3.3 La disminución en los niveles de DaPKC no altera la proliferación celular

Al contrario que la ganancia de función, la disminución de niveles de aPKC no parece influir en la progresión a través del ciclo celular. Tanto los valores del índice mitótico relativo P/A a las 48 horas de sobreexpresión de UAS-RNAi aPKC ($1,25 \pm 0,4$, $n=5$ frente a $1,04 \pm 0,06$, $n=10$ del control) (Figura R34A) como la incorporación de EdU (Figura R34 B,B') no muestran diferencias entre los compartimentos control y mutantes para aPKC.

La elaboración de perfiles de ciclo celular con FACS muestra similitud en los porcentajes de células en fase G1 entre los compartimentos A y P de discos *en-Gal4 UAS-GFP UAS-RNAi aPKC* ($34,98 \pm 3,76\%$ frente a $28,78 \pm 1,61\%$ respectivamente, $p<0,04$) y entre los compartimentos posterior de discos control *en-Gal4 UAS-GFP* frente a discos *en-Gal4 UAS-GFP UAS-RNAi aPKC* ($31,84 \pm 2,77\%$ frente a $28,78 \pm 1,61\%$ respectivamente, $p<0,09$) (Figura R34C).

RESULTADOS

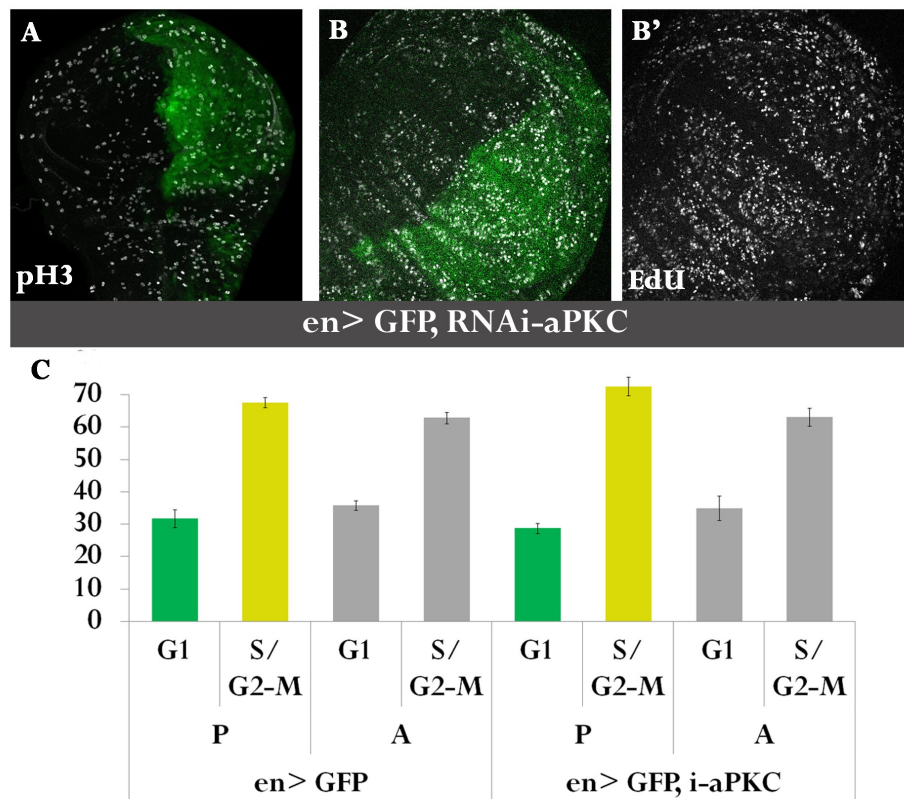
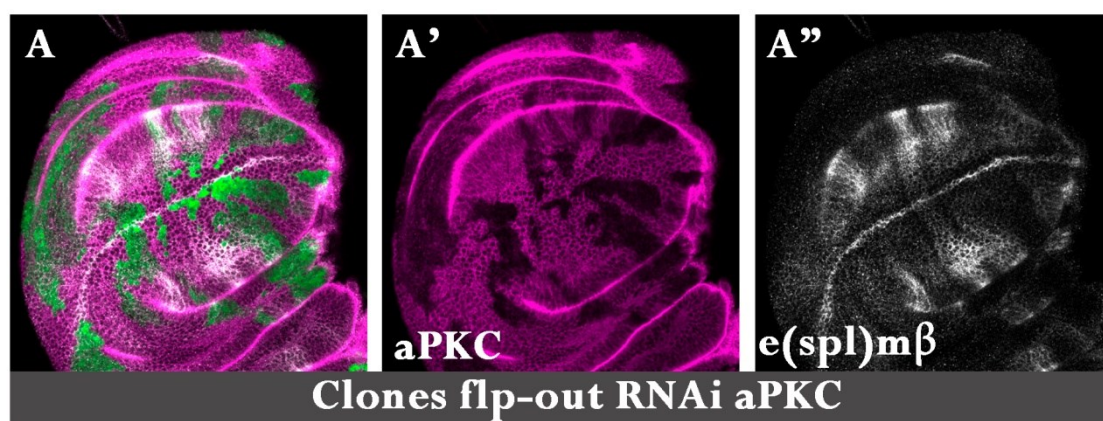
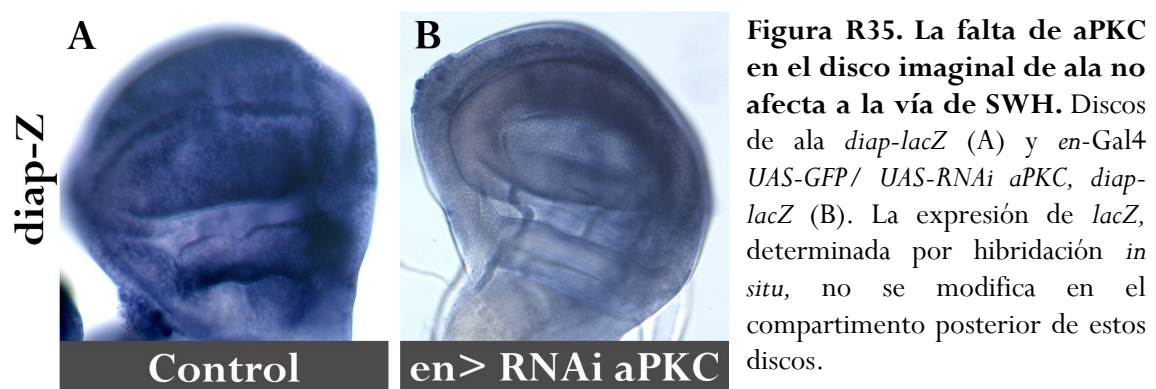


Figura R34. La falta de aPKC no afecta a la proliferación celular. (A) Patrón de células en Mitosis determinado por tinción con anticuerpo anti-pH3 en discos que expresan RNAi aPKC en el compartimento posterior (en verde, genotipo *en-Gal4 UAS-GFP /UAS-RNAi aPKC*). No se aprecian diferencias entre los compartimentos control A y mutante P. (B, B') Patrón de células en fase S determinado por la incorporación de EdU (en blanco). No se aprecian diferencias significativas entre los compartimentos A y P (en verde). (C) Perfiles de ciclo celular obtenidos por citometría de flujo de discos control (*en-Gal4 UAS-GFP*) o mutantes (*en-Gal4 UAS-GFP /UAS-RNAi aPKC*). Las diferencias observadas no son estadísticamente significativas entre compartimentos A y P de discos *en-Gal4 UAS-GFP UAS-RNAi aPKC* y entre los compartimentos posterior de discos control *en-Gal4 UAS-GFP* frente a discos *en-Gal4 UAS-GFP UAS-RNAi aPKC*.

R3.4 No se aprecian alteraciones en las vías de Notch y SWH en condiciones de falta de función de aPKC en el disco de ala

Como se mostró anteriormente, la activación constitutiva de aPKC afecta al funcionamiento de las vías de SWH y Notch. Sin embargo, su falta de función, en condiciones compatibles con la viabilidad celular, no parece modificar al funcionamiento de estas dos vías. La Figura R35 muestra como la transcripción de *Diap1-lacZ* no se altera al expresar *UAS-RNAi aPKC* en el compartimento posterior de discos de ala sugiriendo que la vía de SWH no está afectada. Respecto a la vía de Notch, en la Figura R36 A'' se observa que los niveles de E(spl)m β , y por tanto la actividad de la vía canónica de Notch, no se encuentran alterados en clones de células en el disco de ala que expresan *RNAi aPKC* y presentan niveles indetectables de esta proteína (Figura R36 A') .



DISCUSIÓN

La proteína quinasa C atípica (aPKC), involucrada en la regulación de numerosos procesos biológicos y vías de señalización, es un elemento clave para dar respuesta celular al ambiente que la rodea y para mantener la homeostasis celular, por lo que la desregulación de sus niveles o su deslocalización conlleva alteraciones en el desarrollo del animal (Fields y Regala, 2007; Rosse *et al.*, 2010). Entre sus funciones destaca la regulación de la polaridad celular apicobasal, estando implicada en el mantenimiento del dominio apical, mediante la fosforilación de otras moléculas que son retenidas o excluidas de este dominio por la acción de aPKC (Tepass, 2012).

En esta Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de ganancia y pérdida de función de aPKC en el disco imaginal de ala. Empleando una estirpe mutante generada en el laboratorio, que permite expresar una forma constitutivamente activa de aPKC (aPKC-CA) y cuya expresión en discos imaginales incrementa su tamaño, hemos tratado de modelizar una situación tumoral asociada al incremento de la actividad de aPKC (Fields y Regala, 2007; Murray *et al.*, 2011) con el objetivo de analizar las causas de estos sobrecrecimientos y los mecanismos implicados para ello. De este modo hemos observado que aPKC se comporta como un oncogén en *D. melanogaster*, aumentando la proliferación celular, alterando la polaridad celular y promoviendo la migración celular. Sin descartar que la sobreexpresión de aPKC-CA en el disco de ala afecte a alguna de las vías de EGFR, JAK/STAT o Wnt que controlan la proliferación celular, nuestros resultados indican que los fenotipos asociados a la sobreexpresión de aPKC-CA se deben a la desregulación de las vías de SWH, JNK y quizás también, de la vía de Notch.

D1. Cáncer en *Drosophila*

Drosophila es un buen organismo modelo para el estudio de genes implicados en procesos tumorales y en el desarrollo de las características tumorales de origen celular (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011) tales como el incremento de la proliferación, la evasión de mecanismos de muerte celular, migración e invasión, pérdida de adhesión celular y polaridad e inestabilidad cromosómica. Otras propiedades del cáncer de origen tisular, como la angiogénesis (Potter, 2007) no pueden ser estudiadas como tal en

DISCUSIÓN

Drosophila al no poseer éstas un sistema vascular propiamente dicho (revisado en Potter *et al.*, 2000; Hariharan y Haber, 2003; Bilder, 2004; Brumby y Richardson, 2005; Hariharan y Bilder, 2006; Vidal y Cagan, 2006; Polesello *et al.*, 2011; Rudrapatna *et al.*, 2012).

Por otra parte, la generación de tumores en humanos requiere la cooperación de varias mutaciones (Vogelstein *et al.*, 2013). La larga vida media de los mamíferos conlleva la acumulación de mutaciones en oncogenes o en TSG (Bissell y Hines, 2011), por lo que se han desarrollado mecanismos de redundancia y de control para evitar su efecto deletéreo (Rando, 2006). La menor redundancia génica en *Drosophila* hace sin embargo que mutaciones puntuales en TSG puedan generar tumores (Bilder, 2004; Hariharan y Bilder, 2006). Posiblemente el corto ciclo de vida de *Drosophila* y el menor número de divisiones celulares han permitido a estos insectos su adaptación evolutiva sin la necesidad de estos mecanismos de protección frente a las mutaciones espontáneas oncogénicas (Bilder, 2004).

D2. La proteína quinasa C atípica es un oncogén en mamíferos y *Drosophila*

Los niveles de PKC ϵ , ortólogo de DaPKC en vertebrados, están aumentados y la proteína está deslocalizada en numerosos tipos de carcinomas y su sobreexpresión implica una peor supervivencia de los pacientes. Por ello PKC ϵ se clasifica como un oncogén en vertebrados (revisado en Fields y Regala, 2007; Murray *et al.*, 2011).

A nivel molecular, PKC ϵ promueve señales de supervivencia a través de NF κ B (Lu *et al.*, 2001), se requiere para el crecimiento tumoral mediado por la vía de Ras-Rac1 (Díaz-Meco *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 2004) y favorece la migración celular e invasión mediante fosforilación de Calpaínas (Xu y Deng, 2006) (Revisado en Fields y Regala, 2007; Murray *et al.*, 2011) (Figura D1).

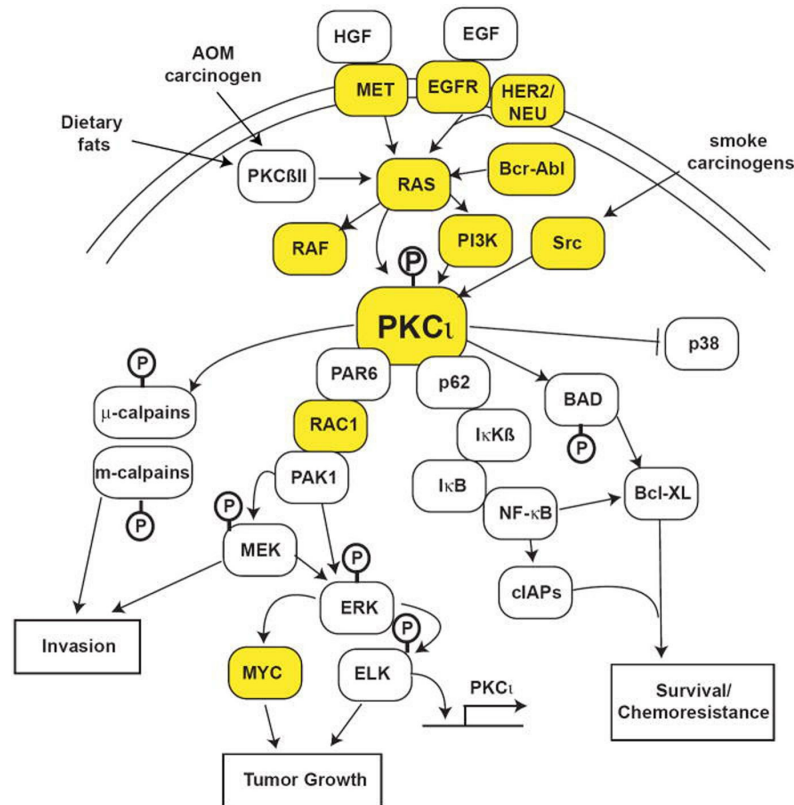


Figura D1. Representación de las principales vías oncogénicas en las que interviene PKCι. Esquema de Regala y Fields (2007).

Estudios previos realizados en *Drosophila* ya habían descrito cómo la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de aPKC en discos imaginales generaba sobrecrecimientos (Sotillos *et al.*, 2004; Eder *et al.*, 2005; Grifoni *et al.*, 2007; Leong *et al.*, 2009; Grzeschik *et al.*, 2010). Para determinar si aPKC podía ser considerado como un oncogén en *Drosophila*, en esta Tesis hemos analizando distintas características representativas de los tumores en los discos imaginales que han crecido de manera excesiva debido a la expresión de aPKC-CA.

D2.1 aPKC-CA incrementa la proliferación celular

Los sobrecrecimientos asociados a la sobreexpresión de *aPKC-CA* (Figuras I6, R1, R2, R4) se deben a un incremento de la proliferación celular (Figura R5). La sobreexpresión de *aPKC-CA* promueve una aceleración del ciclo celular favoreciendo el paso de G1-S (Figura R5 H-I), asociado a un incremento en los niveles de Ciclina E (Figura R18 D-D').

Esta proliferación excesiva se observa asociada a la expresión de *aPKC-CA* en discos imaginales, tejidos que intrínsecamente están proliferando de modo activo, pero hay que remarcar que *aPKC-CA* también es capaz de inducir proliferación en tejidos quiescentes como es el epitelio folicular después del estadio 7 (Rodríguez-Learte et al., en preparación) o el territorio posterior al surco morfogenético en el disco imaginal de ojo dirigida por línea *GMR-Gal4* (Eder et al., 2005; Grzeschik et al., 2010; Parsons et al., 2014), aunque en estos casos el incremento de proliferación es más sutil que en el disco de ala.

El incremento en la proliferación celular es determinante del fenotipo de sobrecrecimiento de los discos de ala que expresan *aPKC-CA* ya que la co-expresión del regulador negativo de ciclo celular Dacapo, que detiene el ciclo en fase de G1 (Deng et al., 1995; de Nooij et al., 1996), revierte en gran parte el incremento de tamaño de los discos aunque se mantienen los cambios en la morfología celular (Figura R6 C-C'').

Por otra parte, nuestros experimentos muestran que el sobrecrecimiento se produce de modo autónomo en las células mutantes ya que el territorio que muestra hiperproliferación es aquel que sobreexpresa *aPKC-CA* mientras que el territorio control mantiene un ritmo de crecimiento normal. Esto puede observarse (a) a nivel histológico, donde en cruces *en> GFP*, *aPKC-CA* solamente aparece sobrecrecido, con pliegues y con arquitectura tisular alterada el compartimento posterior mutante, visualizado por la coexpresión de GFP (Figura I6 A,C), además de presentar niveles elevados de histona H3 fosforilada y de incorporación de EdU solamente en este compartimento (Figura 5 A-F); y (b) a nivel celular, donde por medio de análisis de FACS se observa que las células P de estos discos mutantes presentan un ciclo celular alterado, y sin embargo no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el perfil de ciclo celular de las células del compartimento A en discos *en> GFP*,

aPKC-CA en comparación con el de las células del compartimento A de discos control *en>* GFP (Figura 5 G-I).

El sobrecrecimiento de territorios mutantes *aPKC-CA* está basado principalmente en un aumento de la velocidad de proliferación. Por el contrario, los sobrecrecimientos asociados a mutaciones en los nTSG *lgl*, *scrib* o *dlg* (Agrawal *et al.*, 1995; Bilder, 2004; Sun y Irvine, 2011) o *Rab5* (Ballesteros-Arias *et al.*, 2013) se deben a una extensión del periodo proliferación, pero el ritmo de proliferación celular no es distinguible del de las células silvestres, manteniendo una tasa de proliferación constante (Woods y Bryant, 1989; Brumby y Richardson, 2003; Hariharan y Bilder, 2006; Menendez *et al.*, 2010). Es decir, los discos mutantes *scrib* o *lgl* presentan crecimientos neoplásicos porque son incapaces de detener su proliferación y de pupar (Bilder, 2004).

Encontramos que además de un incremento proliferativo de los discos mutantes *aPKC-CA*, las larvas que contienen estos discos muestran también un retardo en la pupación y tienen más tiempo para proliferar (Figura R9). Normalmente, el tiempo de pupación se adapta para acomodar el crecimiento del disco, y suele amoldarse retrasándose cuando hay lesión de discos imaginales que requiera un tiempo adicional para su regeneración. Este proceso viene mediado por la liberación del péptido Dilp8, que inhibe la biosíntesis de ecdisona (Colombani *et al.*, 2012; Garelli *et al.*, 2012). Dado que los discos mutantes *aPKC-CA* se encuentran dañados y presentan niveles elevados de muerte celular (Figura R7), es posible que esta extensión del estadio larvario se deba a un intento por reparar los daños y que presenten niveles elevados del péptido dilp8, por lo que sería interesante analizar sus niveles en los mutantes *aPKC-CA* en futuros experimentos.

D2.2 *aPKC* afecta levemente a la diferenciación celular

Otra de las características de los tumores malignos es la dediferenciación de las células tumorales. Se ha relacionado la sobreexpresión de *aPKC-CA* en el disco imaginal de ojo con procesos de dediferenciación ya que células situadas tras el surco morfogenético y que deberían diferenciarse como neuronas pierden la expresión del marcador neuronal ELAV (*embryonic lethal, abnormal vision*) (Eder *et al.*, 2005). Sin embargo estos individuos llegan a

DISCUSIÓN

desarrollar ojos que, aunque son un poco mayores que los normales, muestran omatidios diferenciados (salvo en ciertas zonas necrotizadas). De manera similar, los adultos *en>aPKC-CA* también desarrollan alas con amplias zonas necrotizadas pero el resto del tejido presenta diferenciación normal.

D2.3 Migración e invasión asociada a la actividad excesiva de aPKC

Hablar de metástasis en *Drosophila melanogaster* puede parecer algo incongruente dado que en mamíferos la metástasis o propagación de tumores requiere un sistema circulatorio mientras que en la larva o el imago de la mosca todas las estructuras como los discos imaginales se encuentran bañados “literalmente” en la hemolinfa. No obstante, se han empleado diversos métodos para estudiar invasión en *Drosophila*. Uno de ellos se basa en la generación de regiones mutantes en el disco de ojo para posteriormente analizar si invaden otros tejidos, principalmente el sistema nervioso central (SNC) adyacente (Pagliarini y Xu, 2003; Igaki *et al.*, 2006; Uhlirova y Bohmann, 2006; Wu *et al.*, 2010) u otras localizaciones más distantes (Ferres-Marco *et al.*, 2006). También se ha analizado invasión tumoral realizando trasplantes xenográficos de cerebro en abdomen de *Drosophila* (Caussinus y Gonzalez, 2005; Castellanos *et al.*, 2008). En nuestro caso no hemos podido determinar si células *aPKC-CA* de discos de ojo invaden el SNC porque estos discos presentan una gran alteración tisular (Figura S2).

Otros autores hablan de migración invasiva cuando células de un compartimento aparecen dispersas en compartimentos distintos (Vidal *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2013). La sobreexpresión de *aPKC-CA* con *en-Gal4* o *dpp-Gal4* provoca este tipo de migraciones invasivas, pudiendo observarse tejido mutante en localizaciones ectópicas del disco propio (Figura R12). Del mismo modo, las células foliculares mutantes *aPKC-CA* muestran un carácter invasivo, introduciéndose entre las células nutricias de la línea germinal (Figura S3).

Además, sobreexpresando *aPKC-CA* se incrementa la producción de metaloproteasas *mmp1* (Figura R12) y se aprecia una bajada en los niveles de E-cadherina (Figura R11), (quizás debido a la degradación de E-cadherina dependiente de metaloproteasas (Lee *et al.*, 2014), lo que facilitaría y favorecería su migración. Estos datos son consistentes con

experimentos realizados en carcinomas de mama (Rosse *et al.*, 2014) y en cultivos celulares (Ahmad *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2013) en los que se observa la correspondencia entre niveles elevados de PKC α y de la metaloproteasa MT1-MMP, demostrando la base molecular de la correlación existente entre el alto riesgo de padecer metástasis y la presencia de niveles elevados de estas proteínas.

D2.4 aPKC-CA altera la polaridad y la arquitectura tisular

La pérdida de polaridad se asocia frecuentemente al desarrollo de tumor y malignidad (Fish y Molitoris, 1994; Bissell y Radisky, 2001; Tervonen *et al.*, 2011; Ellenbroek *et al.*, 2012; Martin-Belmonte y Perez-Moreno, 2012; Grifoni *et al.*, 2013). La sobreexpresión de aPKC-CA en el disco de ala deslocaliza a otros reguladores de polaridad apicobasal como Dlg o E-cadherina (Figura R11) aunque los niveles apicales de Crumbs, sin embargo, no parecen estar afectados (Figura R10). Posiblemente como causa de la alteración en la polaridad, la morfología celular y tisular se modifica, el epitelio pasa de pseudoestratificado a multicapa (Figuras R1, R2, S3 B-C'') perdiendo muchas células su forma cuboidal y la superficie celular aumenta además de presentar niveles elevados de actina cortical (Figura R1 D-F).

D2.5 La desregulación de aPKC causa apoptosis

En vertebrados aPKC regula la supervivencia celular (Diaz-Meco *et al.*, 1996) en parte a través de la activación de la vía de NF κ B (Lu *et al.*, 2001) (Figura D1). Consecuentemente, los embriones mutantes para aPKC (Wodarz *et al.*, 2000) y los clones o territorios mutantes *aPKC* no sobreviven y son eliminados por apoptosis (Figura R29). Sorprendentemente el incremento de la actividad de aPKC en disco de ala también causa muerte celular (Figura R7), asociada como discutimos más adelante tanto a factores intrínsecos como extrínsecos.

En definitiva, en territorios mutantes aPKC-CA se observa alteración de ciclo celular con hiperproliferación, cambios en la arquitectura tisular y en la polaridad apicobasal y capacidad de migración invasiva. El hecho de que una simple mutación en el gen de *DaPKC*

DISCUSIÓN

en *Drosophila* pueda afectar a todos estos procesos sugiere que estas cualidades están coordinadas de algún modo en los epitelios de *Drosophila*. La postura aceptada es que la polaridad apicobasal es la primera característica que se pierde y el resto son consecuencias secundarias (Hariharan y Bilder, 2006). Por la presencia de todas estas características, podemos concluir que aPKC se comporta como un oncogén en *D. melanogaster*.

D2.6 Causas de la muerte celular asociada a la sobreexpresión de aPKC-CA

La activación de la apoptosis puede deberse a procesos intrínsecos, propios de la célula mutante, como por ejemplo causada por la alteración en la polaridad o por el exceso de la proliferación, pero también puede ser mediada por mecanismos no autónomos o extrínsecos a la propia célula, dependiente del ambiente e inducida por el tejido circundante, por ejemplo, por competición celular (Igaki, 2009).

De hecho, la falta de polaridad apicobasal causa apoptosis como se observa en embriones *crb* (Tepass et al, 1990) y *DaPKC* (Wodarz et al., 2000). Clones de células mutantes *dlg*, *lgl* o *scrib* son eliminados por apoptosis en el disco de ala (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003; Igaki et al., 2009; Menendez et al., 2010), lo cual implica la presencia de sistemas de control aparecidos durante la evolución empleados para eliminar células tumorales. Esta muerte clonal es dependiente de activación de la vía de JNK (Brumby y Richardson, 2003; Uhlirova et al., 2005; Menendez et al., 2010). Por otro lado, la supervivencia de los clones *lgl* en disco de ojo se ha atribuido a no tener alterada su polaridad apicobasal (Grzeschik et al., 2010).

La muerte celular al sobreexpresar aPKC-CA puede tener como otra causa intrínseca el estrés oncogénico asociado al exceso de proliferación. Se ha descrito que la activación de oncogenes como *c-myc* o *Ras*^{V12} o de genes promotores de crecimiento como *E2F-1* no solamente favorece la proliferación sino que también promueve apoptosis (Askew et al., 1991; Evan et al., 1992; Kauffmann-Zeh et al., 1997; Karim y Rubin, 1998; Phillips et al., 1999; Lowe et al., 2004; Meyer et al., 2006; Bretones et al., 2014). En este caso, bloqueando el ciclo celular en la región mutante, debería observarse menos apoptosis.

Nuestros datos preliminares apuntan a que este es el caso ya que la sobreexpresión de *dacapo*, además de reducir la hiperproliferación de los discos *en>aPKC-CA* causa una cierta disminución en los niveles de caspasa 3 activada (datos no mostrados).

La observación de que las células *aPKC-CA* en apoptosis se encuentran en muchas ocasiones en los bordes entre el territorio *aPKC-CA* y el territorio control (Figura R7 C-C'') sugiere que la muerte de éstas células puede deberse a fenómenos no autónomos de competición celular. Los niveles de dMyc son críticos en este proceso (de la Cova *et al.*, 2004; Moreno y Basler, 2004). En condiciones silvestre dMyc se expresa preferentemente en el disco de ala en las regiones de notum y del ala (Figura R16 A). Posiblemente estas regiones sean más sensibles a las variaciones en los niveles de dMyc que los territorios de la axila o las pleuras, y por ello la bajada de los niveles de dMyc en el ala por sobreexpresión de *aPKC-CA* causa muerte celular mientras que en las pleuras no parece comprometer en la misma medida la supervivencia celular.

Clones de células mutantes *dlg*, *lgl* o *scrib* son eliminados por competición celular en los epitelios imaginales (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003; Igaki *et al.*, 2009; Menendez *et al.*, 2010) y se ha observado un incremento en la supervivencia de los clones *lgl* al aumentar los niveles de dMyc (Froldi *et al.*, 2010). De manera similar la supervivencia de los clones que expresan *aPKC-CA* mejora (aunque no se evita la muerte completamente) aumentando en ellos los niveles de dMyc (Figura R17) principalmente en la región de las pleuras y la axila. Al igual que en nuestro caso; los clones *lgl*^{-/-}, *UAS-dMyc* también sobrecrecen principalmente fuera de la región presuntiva de ala pero no dentro de ella, indicando distintos requerimientos de dMyc para la proliferación en el disco de ala.

Por otra parte, y del mismo modo que en los experimentos descritos en Menéndez *et al.*, (2010), donde se muestra que es necesario un microambiente favorable para la supervivencia de clones *lgl*, la supervivencia los clones *aPKC-CA* mejora al estar rodeados por territorio mutante en vez de por territorio silvestre, ya que aumentando su relación volumen/superficie evitan que gran parte del territorio mutante sea eliminado por competición celular al enfrentarse con el territorio silvestre (Figuras R13-15).

D3. Mecanismos moleculares de la hiperproliferación asociada a aPKC-CA

D3.1 Inactivación de la vía de SWH

Nuestros resultados indican la inactivación de la vía de SWH en el disco de ala por la sobreexpresión de *aPKC-CA*. Esta afirmación se basa en la activación de la transcripción de varios genes diana de Yki (Figura R18) y en la reversión parcial del fenotipo mutante de discos y adultos *en>aPKC-CA* al reducir la dosis de *yorkie* (Figuras R19-21). La mortalidad asociada a la expresión de *aPKC-CA* disminuye un 17% en condiciones de heterocigosis de *yki* y los adultos presentan cierta mejora en los fenotipos en el ala (Figuras 20-21). Sin embargo las diferencias son más evidentes al analizar los discos de ala, pues gran parte de los imagos *en>aPKC-CA* que no llegan a eclosionar son viables en estadio larvario y posiblemente sólo llegan a adulto los menos afectados.

Nos preguntamos a qué nivel (o niveles) aPKC-CA podía estar afectando a la vía de SWH. Los experimentos de epistasia realizados (Figura R23) ayudan a posicionar a aPKC dentro del esquema general de esta vía (Esquema D2).

El fenotipo de sobreexpresión de *aPKC-CA* se recupera parcialmente en mutantes heterocigóticos *yki*, pero sin embargo mutantes *aPKC* heterocigóticos o la sobreexpresión conjunta de *UAS-RNAi DaPKC* y *UAS-yki* no rescatan el sobrecrecimiento asociado a la sobreexpresión de *yki* (Figura R22) lo que sugiere que aPKC requiere la actividad de Yki para inducir el sobrecrecimiento pero no a la inversa, actuando por tanto aPKC por encima de Yki en la vía de SWH. aPKC también actuaría por encima de Hippo, ya que la co-expresión de aPKC-CA con Hippo no genera sobrecrecimientos ni difiere del efecto de la expresión de Hippo por sí solo (Figura R23 B, C). Asimismo, aPKC se sitúa por debajo de CpA al no revertirse las alteraciones generadas por aPKC-CA al sobreexpresar CpA (Figura R23 D, E). Respecto a Kibra, los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de *kibra* parece corregir el efecto de crecimiento excesivo asociado a la expresión de aPKC-CA (Figura 23 F, G), unido a la ya descrita inactivación mutua de aPKC y Kibra (Buther *et al.*, 2004; Yoshihama *et al.*, 2011) sugieren que Kibra actúa por encima de aPKC en la vía de SWH.

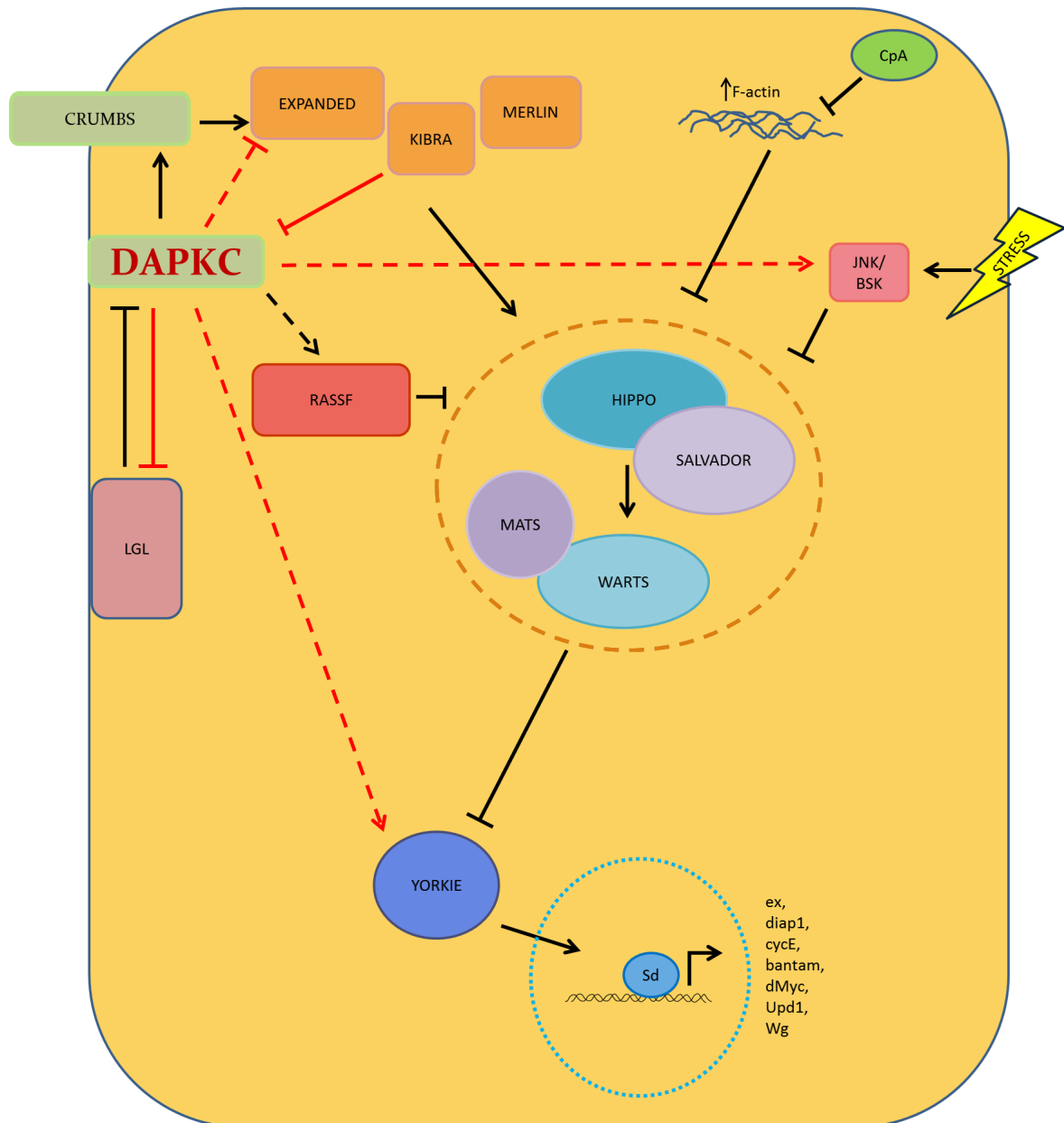


Figura D2. Esquema representativo de la función de aPKC en la vía de SWH. Las puntas de flecha o líneas truncadas indican activación o inhibición, respectivamente. Las líneas discontinuas representan mecanismos desconocidos. En rojo las interacciones analizadas durante la realización de esta Tesis Doctoral.

D3.1.1 La fosforilación de Expanded no parece depender de aPKC

Es muy interesante nuestra observación de que la proteína Ex se deslocaliza de la membrana apical al sobreexpresar *aPKC-CA* (Figura R24). Ex se localiza en la membrana apical por su unión al FBD de Crb (Chen *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010). En este dominio de la membrana Ex, formando parte de un complejo proteico con Merlin y Kibra, ayuda a la inhibición de Yki por fosforilación (Baumgartner *et al.*, 2010; Genevet *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010).

Crb localiza a Ex apicalmente pero también controla el exceso de Ex promoviendo su degradación mediada por ubiquitina y dependiente de fosforilación (Chen *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014). Dada la localización apical de Ex y su interacción con Crb, la estrecha relación física y funcional de Crb y aPKC (Sotillos *et al.*, 2004) y la alta probabilidad de que Ex sea un sustrato de aPKC (analizado con el programa de predicción de fosforilación Net Phosk 1.0, Anexo 3) nos planteamos examinar si aPKC-CA fosforila a Ex causando por ello su eliminación de la membrana apical. Para ello realizamos experimentos *in vitro* en cultivos de células de *Drosophila* S2R+ en las que no se expresa Crb (FlyBase). Crb es necesario para situar a Ex en membrana apical, pero en ausencia de Crb, una forma miristoilada de Ex (Ex-myr, dirigida a membrana) también se fosforila (Ling *et al.*, 2010). Expresamos Ex y Ex-myr en las células *Drosophila* S2R+ y observamos que Ex-Myr seguía fosforilado en presencia del inhibidor genérico de PKCs *cheletrytrine* (Figura R25). Por tanto nuestros experimentos indican que Ex no es fosforilado por aPKC, aunque posiblemente habría que emplear un inhibidor más específico de aPKC para descartarlo completamente. Otro abordaje que vamos a emplear es el análisis de la posible fosforilación de Ex por aPKC usando un anticuerpo que detecta sustratos de fosforilación de las PKC atípica y nuevas.

Ribeiro *et al.*, en un reciente artículo (2014) descartan una hipotética fosforilación de Ex por aPKC por dos razones. Primera, la sobreexpresión de una proteína aPKC-DN revierte la alteración de la polaridad asociada a sobreexpresión de Crb-intra, pero no rescata los sobrecrecimientos asociados (Sotillos *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2010), que dependen de la alteración de la vía de SWH (Robinson *et al.*, 2010). Segunda, la eliminación del

dominio PBM por el cual Crb se une a Par6 del complejo aPKC/Par6 no influye en la acción de Crb-intra sobre el aumento de fosforilación y eliminación de Ex (Ling *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014). Por tanto el conjunto de estas observaciones con las de esta Tesis sugieren que Crb y aPKC podrían controlar la vía de SWH de modo independiente y queda por identificar qué quinasa fosforila a Ex cuando se encuentra unida al dominio apical.

D3.1.2 La inactivación de Lgl por aPKC como mecanismo de la represión de la actividad de la vía de SWH por esta quinasa

Los mecanismos de exclusión mutua entre proteínas de los complejos apical y basolateral aseguran la separación de dominios de membrana (Bilder *et al.*, 2003; Tanentzapf y Tepass, 2003; Fletcher *et al.*, 2012). aPKC fosforila a Lgl eliminando su asociación a la membrana e inactivándola (Betschinger *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2003; Rolls *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003; Tian y Deng, 2008). Por ello, se considera la sobreexpresión de aPKC-CA como sinónimo de la falta de función de *Lgl*. Dado que la falta de función de *Lgl* en el disco de ojo inactiva la vía de SWH (Grzeschik *et al.*, 2010), examinamos si la inactivación de Lgl por aPKC-CA podría ser una de las causas de los fenotipos mutantes de los discos de ala *en>aPKC-CA*. Co-expresando aPKC-CA con Lgl de tipo silvestre no se observaron modificaciones fenotípicas pero sí logramos revertir en parte el sobrecrecimiento y la acumulación de actina de los discos al sobreexpresar una forma de Lgl no fosforilable por aPKC (Figura R26), lo que indica que la alteración de la vía de SWH se debe, al menos en parte, a la acción de aPKC sobre Lgl.

Por otro lado y de manera recíproca, una falta de función de *Lgl*, que lleva la distribución de aPKC por toda la membrana celular, se asimila a la activación de aPKC. De acuerdo con esta hipótesis el fenotipo de los clones *Lgl* en el disco de ojo se corrige por expresión de aPKC-DN (Grzeschik *et al.*, 2010). En este disco imaginal, la expresión de aPKC-CA o la falta de función de *Lgl* no alteran la localización apical de Ex pero sí la de RASSF o Hippo (Grzeschik *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010). No se ha estudiado la localización de Ex en clones *Lgl* en el disco de ala porque no son viables. Sin embargo,

DISCUSIÓN

nuestros experimentos mostraron que a diferencia del disco imaginal de ojo, en el disco imaginal de ala, en regiones *aPKC-CA* que serían equivalentes a zonas mutantes para *lgl* sí que hay una evidente deslocalización de la proteína Expanded del dominio apical (Figura R24).

Por último hay que señalar que el aumento en la proliferación celular en mutantes *aPKC-CA* podría depender de mecanismos distintos a la deslocalización e inactivación de *Lgl* ya que en mutantes *lgl* no aumenta la velocidad de proliferación celular (Menendez *et al.*, 2010).

D3.2 La activación de la vía de JNK por aPKC contribuye al fenotipo tumoral

La vía de la JNK interviene en la proliferación, diferenciación, migración, morfogénesis y apoptosis (revisado en Igaki, 2009; Bogoyevitch *et al.*, 2010). Esta vía se activa al expresar *aPKC-CA* y su bloqueo, por la expresión de UAS-RNAi *bsk* que elimina la función del ortólogo en *Drosophila* de JNK, revierte en parte la hiperproliferación de los discos *en>aPKC-CA* (Figura R27 D), lo que indica la implicación de la vía de JNK en la proliferación excesiva de las células *aPKC-CA*.

Los clones de células que expresan *aPKC-CA*, que no sobreviven en el disco de ala, presentan activación de la vía de JNK (Figura R27 B). Clones *scrib*, *lgl* o *dlg*, que también son eliminados del epitelio del disco de ala por apoptosis, presentan asimismo activación de la vía de JNK, y su bloqueo impide la eliminación de las células mutantes (Igaki *et al.*, 2009; Menendez *et al.*, 2010). Sin embargo, el bloqueo de la vía de JNK mediante la sobreexpresión de *puc* no evitó la muerte de clones *aPKC-CA* (datos no mostrados), lo cual es congruente con que en el contexto celular de sobreexpresión de *aPKC-CA*, la vía de JNK esté favoreciendo la proliferación más que la apoptosis.

La activación de la vía de JNK podría contribuir a la inactivación de la vía de SWH asociada a la sobreexpresión de *aPKC-CA* y de esta manera estimular la proliferación celular, ya que se ha descrito previamente que la vía de JNK contribuye a la activación de *Yki* en procesos de regeneración del disco de ala (Sun y Irvine, 2011), cuando se interfiere

con la vía endocítica (Robinson y Moberg, 2011) y cuando se altera la polaridad apicobasal (por expresión de aPKC-CA o falta de función de *lgl*, Sun y Irvine, 2011). Esta interacción funcional parece depender del contexto celular ya que no se observa en el disco de ojo o de pata (Sun y Irvine, 2011) y está mediada por la proteína Ajuba (Sun y Irvine, 2013). Por tanto, proponemos que la activación de JNK por aPKC-CA sería otro mecanismo adicional a la inactivación de Lgl para la represión de la vía de SWH por esta quinasas.

Por otro lado, la activación de la vía de JNK podría contribuir directamente a la capacidad invasiva de las células aPKC-CA por su activación de la expresión de metaloproteasas (Uhlir y Bohmann, 2006).

D3.3 Activación de la vía de Notch por aPKC

En el epitelio folicular Anabel Rodríguez-Learte ha demostrado que tanto la falta como la ganancia de función de aPKC inactivan la vía de Notch mostrando la estrecha dependencia de esta vía de la actividad de aPKC (Learte et al., en preparación). En el disco de ala los resultados de esta Tesis indican que la vía de Notch se encuentra activada en mutantes de sobreexpresión *aPKC-CA* (Figura R28 y S6) aunque sin embargo se mantiene inalterada en condiciones de reducción de aPKC compatibles con la viabilidad celular (Figura R36).

La activación de la vía de Notch induce el crecimiento excesivo de los discos imaginales por lo que su activación por aPKC-CA podría contribuir al sobrecrecimiento de los discos *aPKC-CA*. Sin embargo, el bloqueo de la vía de Notch no revierte el fenotipo de sobrecrecimiento de estos discos (Figuras R28 y S6). De acuerdo con estos datos en el sobrecrecimiento de los discos *aPKC-CA* parece predominar la inactivación de la vía de SWH sobre la activación de la vía de Notch.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de DaPKC constitutivamente activa (aPKC-CA) en el disco imaginal de ala causa su sobrecrecimiento debido a la activación de la proliferación celular, concretamente acelerando el paso de G1 a S en el ciclo celular por aumento de los niveles de Ciclina E. En las larvas que contienen discos mutantes para *aPKC-CA* aumenta también la extensión del periodo larvario de proliferación.
2. Los sobrecrecimientos de tejido del disco de ala asociados a la sobreexpresión de aPKC-CA muestran varios de los rasgos característicos de los crecimientos tumorales neoplásicos: hiperproliferación, alteración de la polaridad apicobasal y capacidad invasiva. Por el contrario, y a diferencia de las células tumorales que evaden la apoptosis, los territorios mutantes para aPKC-CA presentan un elevado número de células en apoptosis que son eliminadas por extrusión basal.
3. Las células mutantes *aPKC-CA* son eliminadas por apoptosis dependiente de mecanismos autónomos (alteraciones en la polaridad apicobasal, estrés oncogénico) y no autónomos (competición celular). Aumentar los niveles de dMyc no es suficiente para contrarrestar la muerte de las células mutantes *aPKC-CA* en la región presuntiva de ala pero sí en la región de las pleuras o de la axila alar en el disco de ala.
4. Los sobrecrecimientos causados por la sobreexpresión de *aPKC-CA* dependen de la inactivación de la vía de Salvador-Warts-Hippo. La reducción de la dosis de *Yki* suaviza el fenotipo de sobrecrecimiento en el disco de ala y de alteración tisular del ala adulta.
5. En el disco de ala, aPKC actúa sobre la vía de SWH regulando la localización subcelular y los niveles de Expanded.

CONCLUSIONES

6. Expanded no parece ser un sustrato de fosforilación de aPKC.
7. La inactivación de Lgl por aPKC contribuye al exceso de crecimiento de los discos imaginales.
8. Los sobrecrecimientos asociados al aumento de actividad de aPKC son causados en parte por activación de la vía de JNK. El bloqueo de esta vía reduce los sobrecrecimientos causados por la expresión de aPKC-CA.
9. La vía de Notch se activa en los mutantes aPKC-CA pero la interferencia con esta vía no es suficiente para rescatar el fenotipo de sobrecrecimiento.
10. aPKC se necesita para el mantenimiento de la polaridad celular. Las células del disco imaginal del ala que carecen de aPKC son eliminadas por apoptosis.

ANEXOS

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

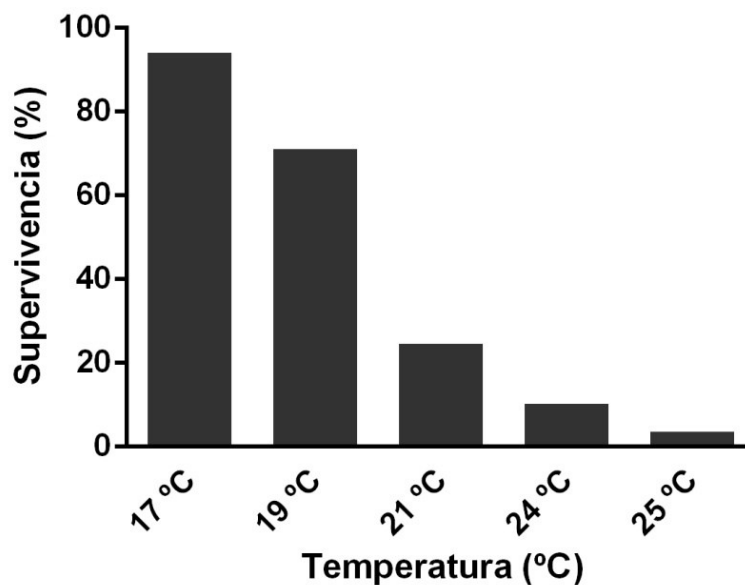


Figura S1. La viabilidad de las larvas que expresan aPKC-CA dirigida por *en*-Gal4 se reduce al aumentar la cantidad de proteína aPKC-CA. Tras mantener las puestas del cruce *en*-Gal4/CyO x *UAS-DaPKC^{CAAX-wt}* a 17°C durante el estadio embrionario, se pasaron las larvas a distintas temperaturas para determinar la tasa de supervivencia a adultos. Se estimó el grado de supervivencia como el porcentaje de adultos *en*-Gal4; *UAS-DaPKC^{CAAX-wt}* frente al número de adultos CyO; *UAS-DaPKC^{CAAX-wt}*. Los valores de supervivencia obtenidos fueron del 94% a 17 °C (N=73); 71% a 19 °C (N=243); 24,6% a 21 °C, (N=488); 10,3% a 24 °C (N= 171) y 3,5% a 25 °C (N= 397), siendo N la población total.

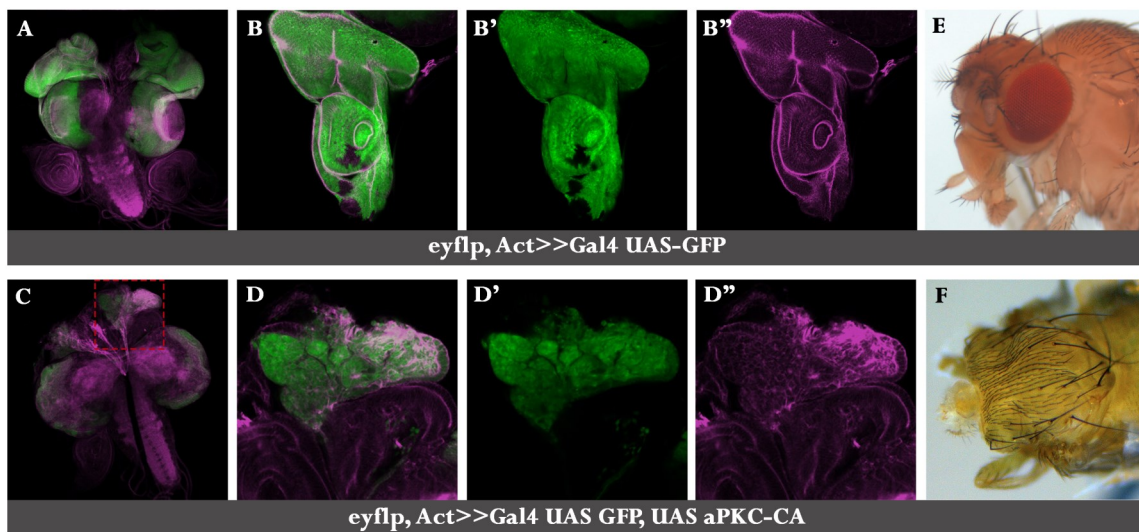


Figura S2. La sobreexpresión de *aPKC-CA* afecta gravemente al desarrollo del disco de ojo. Indujimos la sobreexpresión *aPKC-CA* y GFP en el disco de ojo a lo largo de todo su desarrollo y en todas sus células (ver Materiales y Métodos M 1.2.2) (C-D'') y comparamos su desarrollo con el de discos de ojo que sólo expresan GFP, obtenidos en las mismas condiciones (A-B''). (A, C) Complejos formados por cerebros y discos de ojo, B-B', D-D', discos de ojo aislados. Como se observa en C-D'', los discos de ojo mutantes aparecen disgregados. La región delimitada por el cuadro de línea discontinua roja en C se muestra ampliada en D-D''. (E, F) Los adultos faratos con disco de ojo mutante para *aPKC-CA* carecen de todas las estructuras derivadas del disco de ojo-antena (ojo, antena, capsula cefálica y palpos maxilares) (F, comparar con el adulto de tipo silvestre mostrado en E) .

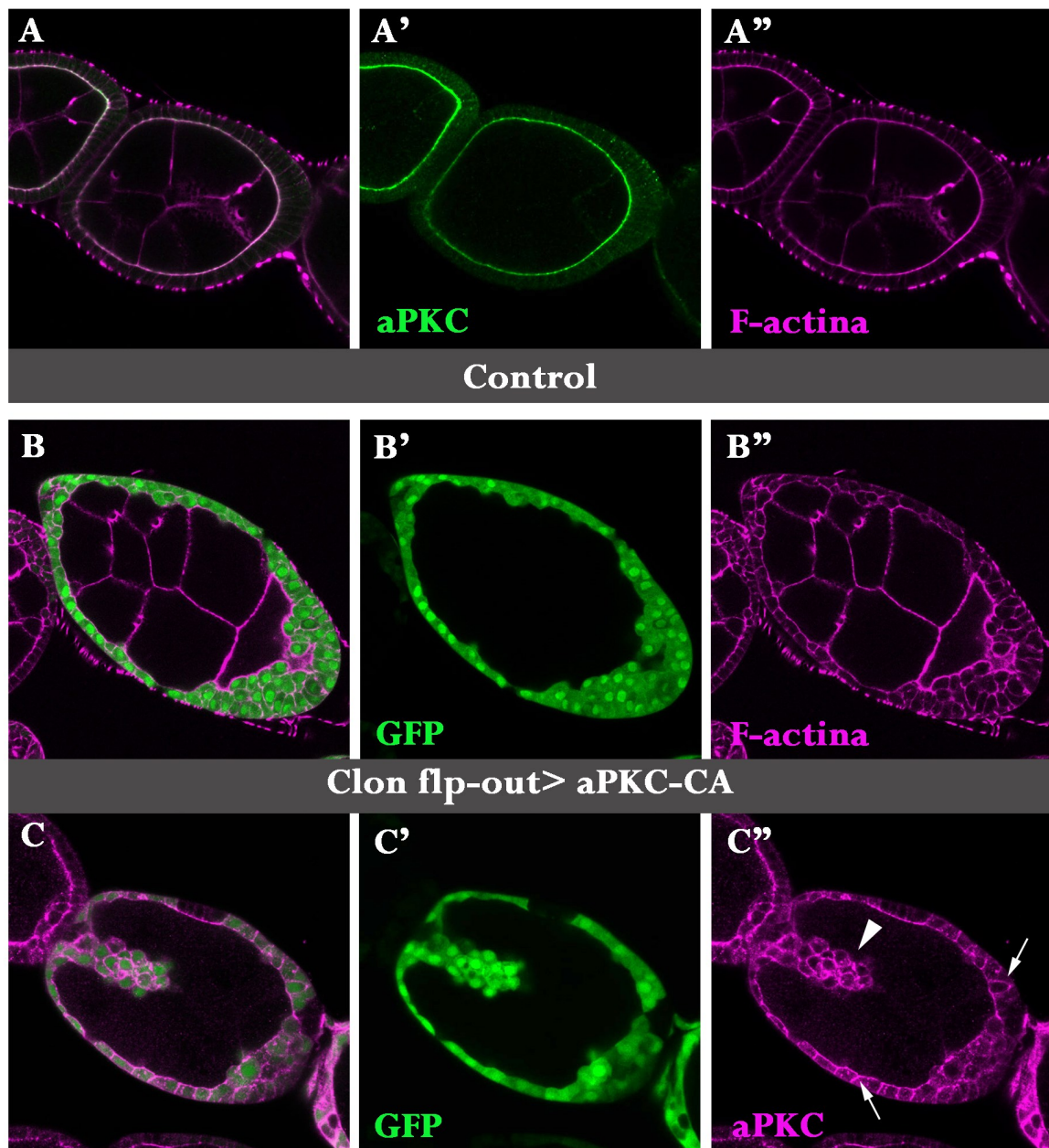


Figura S3. La expresión de *aPKC-CA* en el epitelio folicular causa exceso de proliferación. (A-A'') Ovariolas control. El epitelio folicular de tipo silvestre está formado por una monocapa de células epiteliales columnares que rodea a las células de la línea germinal. En verde, localización apical de aPKC determinada por tinción con anticuerpo anti-aPKC (A') y en magenta la de la actina cortical monitorizada por tinción con faloidina (A''). (B-C'') Clones de sobreexpresión de *aPKC-CA* en epitelio folicular, marcados con GFP teñidos con faloidina o anticuerpo anti-aPKC según se indica. El epitelio aparece en forma de multicapa en la región de los polos. Las células foliculares mutantes situadas en los polos han adquirido forma redondeada. En ocasiones, las células mutantes *aPKC-CA* invaden el territorio de la línea germinal (punta de flecha). Obsérvese en C y C'' cómo en las células que sobreexpresan *aPKC-CA* esta proteína se encuentra en todo el contorno celular (flecha). El polo anterior en todas las cámaras de huevo se encuentra a la izquierda y el posterior a la derecha.

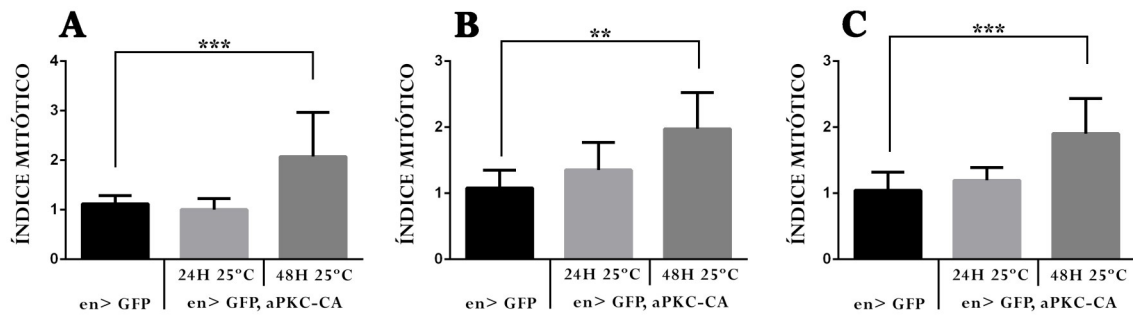


Figura S4. Comparación de los índices mitóticos relativos P/A teniendo en cuenta todo el área del compartimento anterior y posterior del disco propio (A). En B y C se calculó el índice mitótico relativo considerando también las células en mitosis del epitelio peripodial en la región presuntiva del ala (B) y en todo el disco de ala (C). ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$

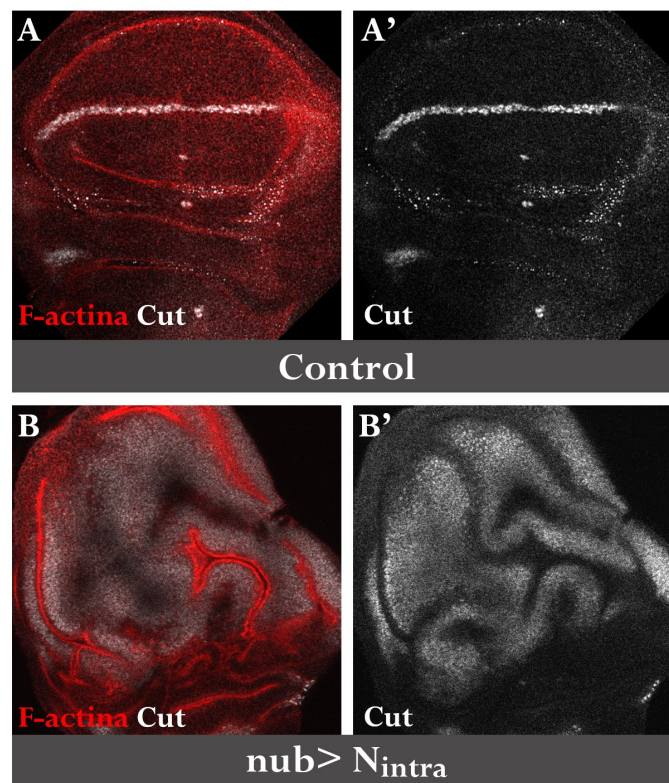


Figura S5. La sobreexpresión de la parte intracelular de Notch genera **sobrecrecimientos** en el disco de ala. Discos de ala control (A,A') o que expresa Notch-intra en todo el dominio del ala bajo el control de *nub*-Gal4 (B,B') teñidos con anticuerpo anti-Cut (en blanco) y faloidina (en rojo). Nótese la expresión generalizada de *cut* y el sobrecrecimiento del disco.

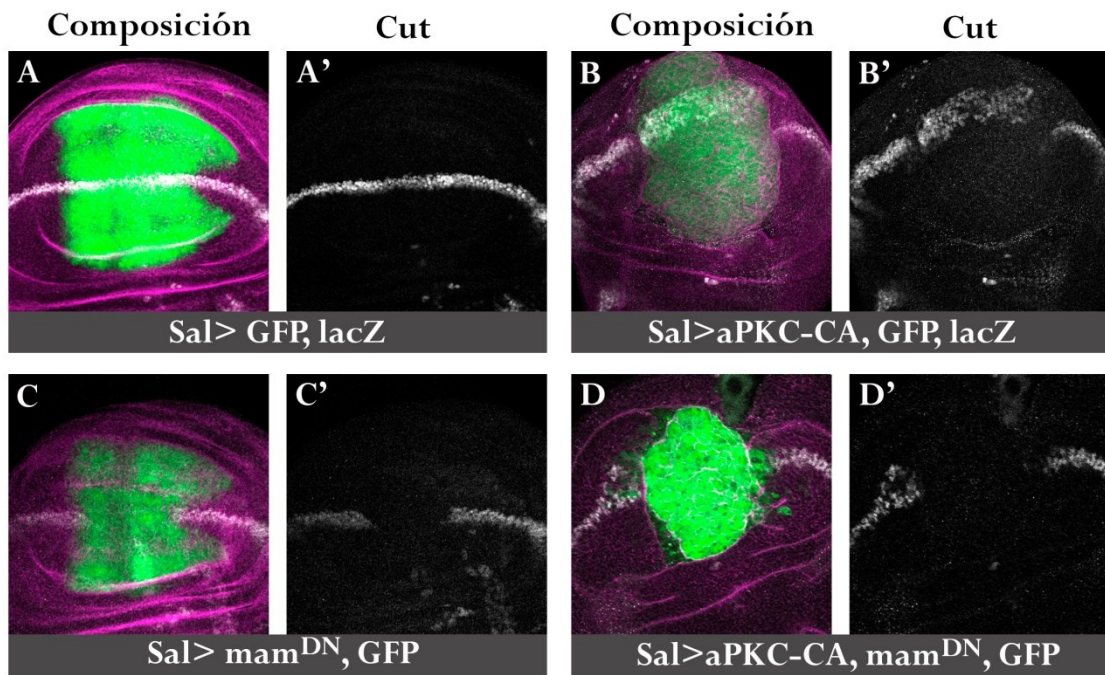


Figura S6. aPKC-CA activa la vía de Notch pero el bloqueo de esta vía no modifica el efecto fenotípico de la sobreexpresión de aPKC-CA. Discos de ala de los genotipos indicados teñidos con un anticuerpo anti-Cut (blanco) y con faloidina (magenta). (B-B'') Aumento de niveles de Cut en la región mutante para *aPKC-CA*, con el característico fenotipo de alteración del citoesqueleto de actina (B''). (C-C'') La expresión de *mam^{DN}* elimina la transcripción de *cut* (C') en el territorio mutante (marcado en verde en C) sin afectar al citoesqueleto de actina ni al tamaño del disco (C''). (D-D'') Discos que coexpresan *aPKC-CA^{wt}*, *mam^{DN}* y GFP en el dominio *sal*. (D) Desaparece la expresión de *cut* el territorio mutante, pero se mantienen la modificación en los niveles de actina y la desorganización del epitelio.

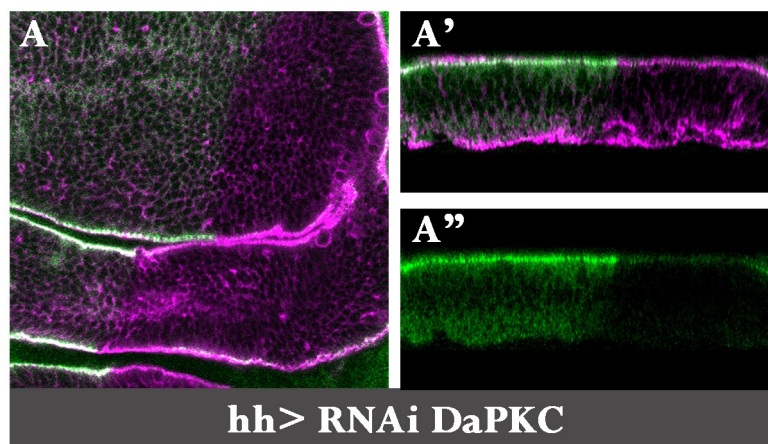


Figura S7. Secciones ópticas tangencial (A) y sagitales (A', A'') de la región presuntiva de ala de un disco de ala que expresa *UAS-RNAi DaPKC* en el compartimento posterior dirigido por *hedgehog-Gal4* (*hh-Gal4*). La tinción con el anticuerpo anti-aPKC (verde) muestra la gran disminución de los niveles de aPKC en las células que expresan *UAS-RNAi DaPKC*. El disco está teñido también con faloidina (magenta).

ANEXO

ANEXO 1

ANTICUERPO	ANTISUERO	ORIGEN	DILUCIÓN
PRIMARIO	OBTENIDO		
ANTI	EN		
Cadherina E	Rata	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)	1/30
Caspasa 3 activada (Cas3*)	Conejo	Cell Signalling Technology	1/200
CD2	Ratón	AbD Serotec	1/200
Ciclina E	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/100
Crumbs	Ratón	Cedido por E. Knust	1/200
Cut	Ratón	DSHB	1/200
Discs large	Ratón	DSHB	1/100
Digoxigenina-fosfatasa alcalina		Roche	1/30
Expanded	Cobaya	Regalo de Richard Fehon	1/1000
β -Galactosidasa	Ratón	Promega	1/500
β -Galactosidasa	Conejo	Cappel	1/5000
Fosfo-histona H3	Conejo	Cell signalling technology	1/200
Metaloproteasa Mmp1	Ratón	DSHB	1/50
c-myc	Ratón	Babco	1/1500
dMyc	Cobaya	Cedido por G. Morata	1/100
PATJ	Conejo	Cedido por H. Bellen	1/500
PKC ζ	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/100 (para inmunohistoquímica) 1/1000 para Western blot
PKC ζ	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	1/100
p-PKC ζ (Thr 555)	Conejo	Abcam	1/100
Proteína verde fluorescente (GFP)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/200
V5		Invitrogen	1/5000 (para Western blot)
Wingless	Ratón	DSHB	1/30
Yorkie	Cobaya	Cedido por G. Morata	1/500

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados.

ANTICUERPO	ANTISUERO	ORIGEN	DILUCIÓN
SECUNDARIO	OBTENIDO EN		
anti-IgG de conejo-	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
anti-IgG de conejo-	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
anti-IgG de ratón	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
anti-IgG de ratón	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
anti-IgG de cobaya			
anti-IgG de cobaya	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
anti-IgG de rata			
	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 200
anti-IgG de rata			
anti-IgG de rata- HRP	Cabra	Jackson Immuno- Research	1 / 2000

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados.

ANEXO 2

Reactivos

- Acrilamida:bisacrilamida 19:1 (#161-0154, Bio-Rad)
- Agarosa (Conda)
- Aprotinina (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bálsamo de Canadá (Serva)
- beta-mercaptoetanol (Merck)
- BCIP(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate, Roche)
- Benzamidina (Sigma)
- Bio-14dATP (Gibco-BRL)
- Bromuro de etidio (Sigma)
- BSA (Sigma)
- Cacodilato sódico (Sigma)
- Cloruro de Cheleritrina (Sigma)
- Citrato sódico (Merck)
- Cloruro sódico (Merck)
- Dapi Fluoromount-G (SouthernBiotech)
- Diaminobencidina (DAB, Sigma)
- Dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma)
- Deoxynucleotidil transferasa terminal (TdT, Amersham)
- Deoxicolato sódico (Sigma)
- DNA de esperma de salmón
- EDTA, (ácido etilendiaminotetra acético (Merck)
- EdU (Invitrogen)
- Endonucleasas de restricción (Biolabs, Roche)
- Etanol 95% (VWR Chemicals)
- Etanol absoluto (Merck)
- Faloidina- TRITC (Sigma)
- Faloidina- Alexa-Fluor 647 (Sigma)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- Fluoruro sódico (Merck)
- Formamida (Merck)
- Fosfatasa alcalina de intestino de ternero CIP (New England Biolabs)
- Fosfato sódico (Merck)
- Glicerol (Merck)
- H₂O₂ (Foret)
- Heparina (Sigma)

- Hoechst 33342 (Invitrogen)
- Inhibidor de Tripsina (Sigma)
- Insect XPress (Lonza)
- Metanol (Sigma y Merck)
- Medio de Schneider
- Marcador de peso molecular de proteínas (Bio-Rad)
- Membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences)
- NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride, Roche)
- Nonidet NP-40 (USB-Affymetrix)
- Ortovanadato sódico (Sigma)
- Paraformaldehído (Sigma)
- Persulfato sódico o amónico
- PhospoBlocker (Cell Biolabs)
- Phos-tag (Wako Chemicals).
- RNAsa (Sigma)
- SDS (Merck)
- Suero fetal bovino (Sigma)
- TEMED (Bio-Rad)
- Tris (Sigma)
- Triton X100 (Sigma)
- Tripsina-EDTA (Sigma, T-4299)
- Tween 20 (Sigma)
- Vectashield (Vector)
- Xileno (Merck)
- Yoduro de propidio (Sigma)

Soluciones

- PBS x1 (*phosphate buffered saline*): 130mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄.
- 20 X SSC: 3M NaCl, 0.3 M citrato sódico
- Solución de hibridación (SH) : 50% Formamida, 5x SSC, 50 µg/ml Heparina, 0,1% Tween 20 y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón en H₂O·DEPC.

Kits

- ABC elite (Vector)
- Amaxa Cell Line *Nucleofector Kit V* (Lonza)
- Click-iT EdU HCS Assays (Invitrogen)
- ECL GE Healthcare (Amersham)
- Qiagen DNA extraction

ANEXO

ANEXO 3

Method: NetPhosK without ESS filtering:

Query: Expanded Sequence

Site	Kinase	Score
------	--------	-------

S-99	PKC	0.86
T-209	PKC	0.85
T-231	PKC	0.92
S-356	PKC	0.90
T-749	PKC	0.87

Highest Score: 0.92 PKC at position 231

Análisis de predicción por proteínas quinasas específicas de eucariotas.

Net PhosK 1.0 analiza las siguientes quinasas: PKA, PKC, PKG, CKII, Cdc2, CaM-II, ATM, DNA PK, Cdk5, p38 MAPK, GSK3, CKI, PKB, RSK, INSR, EGFR y Src. Del análisis de la secuencia completa de Expanded, la mayor probabilidad de ser fosforilada es por quinasas de la familia PKC.

ANEXO 4

Cruces genéticos

Ensayos de sobreexpresión

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-aPKC-CA (Figuras I6, R1,R5, R7, R9, R10, R11, R12 1B-B', R12 E-E'', R16 B-B'', R18, R24 B-C', S1)

sal-Gal4 , UAS-GFP X UAS-aPKC-CA (Figuras R2, R4E)

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-aPKC^{WT} (Figura R3 A-C')

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-aPKC-DN (Figuras R3 D-E', R24 D, D')

sal-Gal4, UAS-GFP x UAS-aPKC (Figuras R3G)

sal-Gal4 , UAS-GFP X UAS-aPKC-DN (Figuras R3H)

ds-Gal4 x UAS-GFP (Figura R4B)

ds-Gal4 x UAS-GFP; UAS-aPKC-CA (Figura R4F)

dpp-gal4 UAS-GFP x UAS-aPKC-CA (Figuras R4G, R12D)

pnr-Gal4 UAS-GFP x UAS-aPKC-CA (Figura R4H)

en-Gal4 UAS-GFP/CyO tub gal80; UAS-aPKC-CA / TM6b x UAS-lacZ (Figuras R6 B-B'', R23 A, A', R26 A-A''')

en-Gal4 UAS-GFP/CyO tub gal80; UAS-aPKC-CA / TM6b x UAS-p21 (Figuras R6 C-C'')

en-Gal4 UAS-GFP/CyO tub gal80; UAS-aPKC-CA/ TM6b x UAS-p35 (Figuras R8 D-F)

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA / TM6b x Yki^{MB09079}/CyO wg-LacZ (Figura R19)

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA / TM6b x Yki^{MB09079}/If (Figuras R20 y R21)

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-yki (Figura R22 A)

en-Gal4 UAS-GFP x DaPKC^{K06403}/CyO; UAS-yki (Figura R22 B)

ANEXO

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-hippo (Figura R23 B)

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS-aPKC-CA / TM6b x UAS-hippo (Figura R23 C)

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-cpA (Figura R23 D, D')

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA / TM6b x UAS-cpA (Figura R23 E, E')

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-kibra (Figura R23 F, F')

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA / TM6b x UAS-kibra (Figura R23 G, G')

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-ex (Figura R23 H, H')

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA / TM6b x UAS-ex (Figura R23 I, I') *en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA / TM6b x UAS-lgl wt* (Figura R26 B– B''')

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA / TM6b x UAS-lgl 3A (Figura R26 C-C''')

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA x puc-lacZ (Figura R27 A-A''')

en-Gal4 UAS-GFP x UAS-RNAi bsk (Figura R27 C, C')

en-Gal4 UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS- aPKC-CA x UAS-RNAi bsk (Figura R27 D-D''')

sal-Gal4, UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS-aPKC-CA x UAS-lacZ, E(spl)mb CD2 (Figura R28 B-B'')

sal-Gal4, UAS-GFP x E(spl)mb CD2 ; UAS-mamDN (Figura R28 B-B'')

sal-Gal4, UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS-aPKC-CA x E(spl)mb CD2 ; UAS-mamDN (Figura R28 D-D'')

sal-Gal4, UAS-GFP x UAS-lacZ (Figura S6A, A')

sal-Gal4, UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS-aPKC-CA x UAS-lacZ (Figura S6 B, B')

sal-Gal4, UAS-GFP x UAS-mamDN (Figura S6 C, C')

sal-Gal4, UAS-GFP/ CyO tub-G80; UAS-aPKC-CA x UAS-mamDN (Figura S6 D, D')

en-gal4 UAS-GFP x UAS-RNAi aPKC (Figuras R31 A-B'')

sal-Gal4, UAS-GFP x UAS-RNAi aPKC (Figura R31 D)

dpp-gal4 UAS-GFP x UAS-RNAi aPKC (Figura R32 A-A''')

en-gal4 UAS-GFP x UAS-RNAi aPKC (Figuras R33, R34)

en-gal4 UAS-GFP x UAS-RNAi aPKC; Diap1-lacZ (Figura R35)

y w ey-FLP, Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO tub-Gal80, UAS- aPKC-CA /TM6b x UAS-lacZ (Figura S2)

nub-Gal4 x UAS-N intra (Figura S5)

hh-Gal4 x UAS-RNAi aPKC (Figura S7)

Generación de clones en cis

Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO x y w hs-FLP; UAS-aPKC-CA (Figuras R13, R16 C-C'', R17B, S3)

Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO; tub-Gal80^{ts} x y w hs-FLP, UAS-LacZ (Figuras R14 A-B'' y R15 A-C)

Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO; tub-Gal80^{ts} x y w hs-FLP; UAS-aPKC-CA (Figuras R14 C-D'' y R15 D-F)

Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO x y w hs-FLP; UAS-dmyc (Figura R17 A)

Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO x y w hs-FLP; UAS-aPKC-CA; UAS-dmyc (Figura R17 C-E'')

Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO x y w hs-FLP; UAS-aPKC-CA; puc-lacZ (Figura R27 B, B')

Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP / CyO x y w hs-FLP; E(spl)mb CD2 ; UAS-RNAi aPKC (Figura R36)

ANEXO

Generación de clones de falta de función de DaPKC

y w hs-FLP, FRTG13 *DaPKC^{K06403}* / CyO x *y w hs-FLP*; FRTG13 *Ubi-GFP* (Figura R29 A-A''')

y w hs-FLP, FRTG13 *DaPKC^{K06403}* / CyO x *y w hs-FLP*; FRTG13 π -Myc *tub-Gal80*; *tub-Gal4* (Figura R29 B-B'')

y w hs-FLP, FRTG13 *DaPKC^{K06403}* / CyO; *UAS-Diap1* x *y w hs-FLP*; FRTG13 π -Myc *tub-Gal80*; *tub-Gal4* (Figura R29 C-C'')

y w hs-FLP, FRTG13 *DaPKC^{K06403}* / CyO; *UAS-dmyc* x *y w hs-FLP*; FRTG13 π -Myc *tub-Gal80*; *tub-Gal4* (Figura R29 D-D'')

FRT42D *GMR-hid l(2)CL-R^l* / CyO; *ey-Gal4 UAS-FLP* x FRT42D *DaPKC^{K06403}* / CyO (Figura R30 B)

FRT42D *GMR-hid l(2)CL-R^l* / CyO; *ey-Gal4 UAS-FLP* x FRT42D *DaPKC^{K06403}* / CyO; *UAS-aPKC* (Figura R30 C)

FRT42D *GMR-hid l(2)CL-R^l* / CyO; *ey-Gal4 UAS-FLP* x FRT42D *DaPKC^{K06403}* / CyO; *UAS-p35* (Figura R30 D)

ABREVIATURAS

- **%:** tanto por ciento
- **A:** anterior
- **A/P:** anterior/posterior
- **Ac:** actina
- **aPKC:** proteína quinasa C atípica
- **BCIP:** 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate
- **BSA:** albúmina de suero bovino
- **Cad:** Cadherina
- **crb:** *crumbs*
- **CycE:** Ciclina E
- **DEPC:** diethyl pyrocarbonate
- **DIAP:** *Drosophila* Inhibitor of apoptosis proteins (Proteínas inhibidoras de la apoptosis de *Drosophila*)
- **dlg:** *disc large*
- **DNA:** ácido desoxirribonucleico
- **dpp:** *decapentaplegic*
- **DSHB:** Developmental Studies Hybridoma Bank
- **ds:** *dachsous*
- **E(spl):** *Enhancer of Split*
- **ECM:** Matriz extracelular
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetracético
- **EMT:** “*Epithelial-mesenchymal transition*” Transición epitelio-mesénquima
- **en:** *engrailed*
- **ex:** *expanded*
- **F-act:** F-actina o actina filamentosa
- **FACS:** Fluorescence Activated Cell Sorting
- **fase M:** Mitosis
- **FBS:** “*fetal bovine serum*” Suero fetal bovino
- **FBD:** “*Ferm Binding Domain*” Dominio de unión FERM
- **FERM:** “*4.1, Ezrin, Radixin, Moesin*”
- **Flp:** recombinasa Flpasa

ABREVIATURAS

- **FRT:** "*Flp Recombination Target*" Secuencias diana de la recombinasa flp
- **GFP:** "*Green Fluorescent Protein*" proteína fluorescente verde
- **hpo:** *hippo*
- **hs:** "*heat shock*" choque térmico
- **IgG:** inmunoglobulinas
- **JNK:** *Jun N-terminal kinase*
- **KDa:** Kilodalton
- **lgl:** *lethal giant larvae*
- **L1-L5:** venas longitudinales 1-5
- **LI-LIII:** estadios larvarios I-III
- **M:** *Minute*
- **M:** Molar
- **MARCM:** "*Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker*"
- **MET:** "*Mesenchymal to epithelial transition*" Transición de mesénquima a epitelio
- **min:** minutos
- **mM:** mili Molar
- **N:** Notch
- **n:** número de casos
- **NBT:** nitro blue tetrazolium chloridre
- **Notch-intra:** Dominio intracelular de Notch
- **NP-40:** Nonidet-P-40
- **nTSG:** "*neoplastic tumour suppressor gene*" Genes supresores de tumores neoplásicos
- **P:** posterior
- **PBD:** PDZ protein binding domain
- **PBF:** tampón fosfato salino con paraformaldehído al 4%
- **PBS:** "*Phosphate buffered saline*" tampón fosfato salino
- **PBT:** tampón fosfato salino con detergente tritón X100 al 0,1%
- **PBTw:** tampón fosfato salino con detergente tween 20 al 0,1%
- **PBT-BSA:** PBT con albúmina de suero bovina al 3%
- **PDZ:** Post-synaptic density 95/ Discs Large/ ZO-1
- **PFA:** Paraformaldehído

- **PH3:** Fosfohistona H3
- ***pnr:*** *pannier*
- ***puc:*** *puckered*
- **p/v:** relación peso/volumen
- **RNA:** ácido ribonucleico
- **RNAi:** ácido ribonucleico interferente
- **RNAm:** ácido ribonucleico mensajero
- ***sal:*** *spalt*
- ***sav:*** *salvador*
- **TBE:** Tris-borato-EDTA
- **Tris-HCl:** Tris-ácido clorhídrico
- **TSG:** “*tumor suppressor genes*” Genes supresores de tumores
- **tub:** tubulina
- **UAS:** “*Upstream Activated Sequence*”
- **ubi:** ubiquitina
- **v/v:** relación volumen/volumen
- **VDRC:** Vienna Drosophila RNAi Centre
- ***y:*** *yellow*
- ***yki:*** *yorkie*
- **β-Gal:** β-Galactosidasa
- **μg:** microgramo
- **μl:** microlitro

BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, J. M.** (2002). Competition and compensation: coupled to death in development and cancer. *Cell* **110**, 403-406.
- Agrawal, N., Joshi, S., Kango, M., Saha, D., Mishra, A. y Sinha, P.** (1995). Epithelial hyperplasia of imaginal discs induced by mutations in *Drosophila* tumor suppressor genes: growth and pattern formation in genetic mosaics. *Dev Biol* **169**, 387-398.
- Ahmad, N., Wang, W., Nair, R. y Kapila, S.** (2012). Relaxin induces matrix-metalloproteinases-9 and -13 via RXFP1: induction of MMP-9 involves the PI3K, ERK, Akt and PKC-zeta pathways. *Mol Cell Endocrinol* **363**, 46-61.
- Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., Sommergruber, W., Schweifer, N., Wernitznig, A., Beug, H., Foisner, R. y Eger, A.** (2007). The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* **26**, 6979-6988.
- Alarcon, C., Zaromytidou, A. I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A. N., Manova-Todorova, K., Macias, M. J., Sapkota, G., Pan, D. y Massague, J.** (2009). Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* **139**, 757-769.
- Aranda, V., Nolan, M. E. y Muthuswamy, S. K.** (2008). Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene* **27**, 6878-6887.
- Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). The molecular biology of the Notch locus and the fine tuning of differentiation in *Drosophila*. *Trends Genet* **4**, 95-100.
- Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. y Cleveland, J. L.** (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* **6**, 1915-1922.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. y Massey-Harroche, D.** (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 614-630.
- Badouel, C., Gardano, L., Amin, N., Garg, A., Rosenfeld, R., Le Bihan, T. y McNeill, H.** (2009). The FERM-domain protein Expanded regulates Hippo pathway activity via direct interactions with the transcriptional activator Yorkie. *Dev Cell* **16**, 411-420.
- Baena-Lopez, L. A., Rodriguez, I. y Baonza, A.** (2008). The tumor suppressor genes dachsous and fat modulate different signalling pathways by regulating dally and dally-like. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9645-9650.
- Balda, M. S. y Matter, K.** (2009). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 761-767.
- Baluska, F., Volkmann, D. y Barlow, P. W.** (2004). Eukaryotic cells and their cell bodies: Cell Theory revised. In *Ann Bot*, vol. 94 (ed., pp. 9-32).
- Ballesteros-Arias, L., Saavedra, V. y Morata, G.** (2013). Cell competition may function either as tumour-suppressing or as tumour-stimulating factor in *Drosophila*. *Oncogene*.

BIBLIOGRAFÍA

- Baonza, A. y Garcia-Bellido, A.** (2000). Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2609-2614.
- Bate, M. y Arias, A. M.** (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* **112**, 755-761.
- Baumgartner, R., Poernbacher, I., Buser, N., Hafen, E. y Stocker, H.** (2010). The WW domain protein Kibra acts upstream of Hippo in *Drosophila*. *Dev Cell* **18**, 309-316.
- Benton, R. y St Johnston, D.** (2003). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* **115**, 691-704.
- Betschinger, J., Mechtler, K. y Knoblich, J. A.** (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326-330.
- Bialucha, C. U., Ferber, E. C., Pichaud, F., Peak-Chew, S. Y. y Fujita, Y.** (2007). p32 is a novel mammalian Lgl binding protein that enhances the activity of protein kinase C ζ and regulates cell polarity. *J Cell Biol* **178**, 575-581.
- Bier, E.** (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* **6**, 9-23.
- Bilder, D. y Perrimon, N.** (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-680.
- Bilder, D., Schober, M. y Perrimon, N.** (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* **5**, 53-58.
- Bilder, D.** (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* **18**, 1909-1925.
- Bissell, M. J. y Radisky, D.** (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **1**, 46-54.
- Bissell, M. J. y Hines, W. C.** (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* **17**, 320-329.
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. y Zavortink, M.** (1994). The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **120**, 1805-1815.
- Boedigheimer, M. y Laughon, A.** (1993). Expanded: a gene involved in the control of cell proliferation in imaginal discs. *Development* **118**, 1291-1301.
- Bogoyevitch, M. A., Ngoei, K. R., Zhao, T. T., Yeap, Y. Y. y Ng, D. C.** (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 463-475.
- Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E. y Baguna, J.** (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* **280**, 73-86.

- Bossuyt, W., De Geest, N., Aerts, S., Leenaerts, I., Marynen, P. y Hassan, B. A. (2009). The atonal proneural transcription factor links differentiation and tumor formation in *Drosophila*. *PLoS Biol* 7, e40.
- Brand, A. H. y Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bretones, G., Delgado, M. D. y Leon, J. (2014). Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*.
- Brumby, A. M. y Richardson, H. E. (2003). scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J* 22, 5769-5779.
- Brumby, A. M. y Richardson, H. E. (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nat Rev Cancer* 5, 626-639.
- Bryant, D. M. y Mostov, K. E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 887-901.
- Bulgakova, N. A. y Knust, E. (2009). The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci* 122, 2587-2596.
- Burkhart, D. L. y Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8, 671-682.
- Buther, K., Plaas, C., Barnekow, A. y Kremerskothen, J. (2004). KIBRA is a novel substrate for protein kinase Czeta. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 703-707.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. y Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274, 252-255.
- Campuzano, S. y Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* 8, 202-208.
- Capdevila, J. y Guerrero, I. (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J* 13, 4459-4468.
- Carroll, S. B., Grenier, J. K. y Weatherbee, S. D. (2001). From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design Blackwell Publishing Limited.
- Castellanos, E., Dominguez, P. y Gonzalez, C. (2008). Centrosome dysfunction in *Drosophila* neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. *Curr Biol* 18, 1209-1214.
- Caussinus, E. y Gonzalez, C. (2005). Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 37, 1125-1129.
- Claveria, C., Giovinazzo, G., Sierra, R. y Torres, M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* 500, 39-44.
- Colombani, J., Andersen, D. S. y Leopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336, 582-585.

BIBLIOGRAFÍA

- Comer, F. I. y Parent, C. A.** (2007). Phosphoinositides specify polarity during epithelial organ development. *Cell* **128**, 239-240.
- Cordero, J. B., Macagno, J. P., Stefanatos, R. K., Strathdee, K. E., Cagan, R. L. y Vidal, M.** (2010). Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Dev Cell* **18**, 999-1011.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. y de Celis, J. F.** (2009). A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* **183**, 1005-1026.
- Chabu, C. y Doe, C. Q.** (2008). Dap160/intersectin binds and activates aPKC to regulate cell polarity and cell cycle progression. *Development* **135**, 2739-2746.
- Chehrehasa, F., Meedeniya, A. C., Dwyer, P., Abrahamsen, G. y Mackay-Sim, A.** (2009). EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods* **177**, 122-130.
- Chen, C. L., Gajewski, K. M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C. y Halder, G.** (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15810-15815.
- Darwin, C.** (1859). *The Origin of Species by Means of Natural Selection* London: John Murray.
- Das, T. K., Sangodkar, J., Negre, N., Narla, G. y Cagan, R. L.** (2013). Sin3a acts through a multi-gene module to regulate invasion in *Drosophila* and human tumors. *Oncogene* **32**, 3184-3197.
- de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J. y Bray, S. J.** (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* **125**, 4617-4626.
- de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. y Johnston, L. A.** (2004). *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-116.
- de Nooij, J. C., Letendre, M. A. y Hariharan, I. K.** (1996). A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **87**, 1237-1247.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. y Leder, P.** (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-684.
- Diaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-752.
- Diaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-4225.
- Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Municio, M. M., Berra, E., Frutos, S., Sanz, L. y Moscat, J.** (1994). Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* **269**, 31706-31710.

- Diaz-Meco, M. T., Municio, M. M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L. y Moscat, J. (1996). The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* **86**, 777-786.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., JL, G. m.-S., Cavodeassi, F. y Modolell, J. (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev* **13**, 1754-1761.
- Dow, L. E., Elsum, I. A., King, C. L., Kinross, K. M., Richardson, H. E. y Humbert, P. O. (2008). Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling. *Oncogene* **27**, 5988-6001.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N. y Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179-183.
- Eder, A. M., Sui, X., Rosen, D. G., Nolden, L. K., Cheng, K. W., Lahad, J. P., Kango-Singh, M., Lu, K. H., Warneke, C. L., Atkinson, E. N., Bedrosian, I., Keyomarsi, K., Kuo, W. L., Gray, J. W., Yin, J. C., Liu, J., Halder, G. y Mills, G. B. (2005). Atypical PKC α contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12519-12524.
- Eisenhoffer, G. T., Loftus, P. D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C. B., Morcos, P. A. y Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* **484**, 546-549.
- Elsum, I. A. y Humbert, P. O. (2013). Localization, not important in all tumor-suppressing properties: a lesson learnt from scribble. *Cells Tissues Organs* **198**, 1-11.
- Ellenbroek, S. I., Iden, S. y Collard, J. G. (2012). Cell polarity proteins and cancer. *Semin Cancer Biol* **22**, 208-215.
- Enomoto, M. y Igaki, T. (2013). Src controls tumorigenesis via JNK-dependent regulation of the Hippo pathway in *Drosophila*. *EMBO Rep* **14**, 65-72.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. y Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119-128.
- Fernandez, B. G., Gaspar, P., Bras-Pereira, C., Jezowska, B., Rebelo, S. R. y Janody, F. (2011). Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development* **138**, 2337-2346.
- Ferres-Marco, D., Gutierrez-Garcia, I., Vallejo, D. M., Bolivar, J., Gutierrez-Avino, F. J. y Dominguez, M. (2006). Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* **439**, 430-436.
- Field, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R. y Raff, R. A. (1988). Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* **239**, 748-753.

BIBLIOGRAFÍA

- Fields, A. P. y Regala, R. P. (2007). Protein kinase C iota: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol Res* 55, 487-497.
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T. y Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332, 853-856.
- Fish, E. M. y Molitoris, B. A. (1994). Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N Engl J Med* 330, 1580-1588.
- Flagg, R. O. (1988). *Carolina Drosophila Manual*. Burlington: Carolina Biological Supply Company.
- Fletcher, G. C., Lucas, E. P., Brain, R., Tournier, A. y Thompson, B. J. (2012). Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize Crumbs in the *Drosophila* follicle cell epithelium. *Curr Biol* 22, 1116-1122.
- Fortini, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S. y Hariharan, I. K. (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* 150, F23-30.
- Froldi, F., Ziosi, M., Garoia, F., Pession, A., Grzeschik, N. A., Bellosta, P., Strand, D., Richardson, H. E. y Grifoni, D. (2010). The lethal giant larvae tumour suppressor mutation requires dMyc oncoprotein to promote clonal malignancy. *BMC Biol* 8, 33.
- Gamblin, C. L., Hardy, E. J., Chartier, F. J., Bisson, N. y Laprise, P. (2014). A bidirectional antagonism between aPKC and Yurt regulates epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 204, 487-495.
- Gao, X., Neufeld, T. P. y Pan, D. (2000). *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* 221, 404-418.
- Garcia-Bellido, A. y Merriam, J. R. (1971). Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2222-2226.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. y Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* 245, 251-253.
- Garcia-Bellido, A., Lawrence, P. A. y Morata, G. (1979). Compartments in animal development. *Sci. Am.* 241, 102-111.
- Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E. y Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 336, 579-582.
- Gateff, E. y Schneiderman, H. A. (1967). Developmental studies of a new mutant of *Drosophila melanogaster*: Lethal malignant brain tumor (l(2)gl 4). *Am Zool* 7, 760.
- Gateff, E. y Schneiderman, H. A. (1974). Developmental capacities of benign and malignant neoplasms of *Drosophila*. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 176, 23-65.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.

- Genevet, A., Wehr, M. C., Brain, R., Thompson, B. J. y Tapon, N. (2010). Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev Cell* **18**, 300-308.
- Genevet, A. y Tapon, N. (2011). The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. *Biochem J* **436**, 213-224.
- Giraldez, A. J. y Cohen, S. M. (2003). Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development* **130**, 6533-6543.
- Go, M. J., Eastman, D. S. y Artavanis-Tsakonas, S. (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in Drosophila development. *Development* **125**, 2031-2040.
- Goberdhan, D. C., Paricio, N., Goodman, E. C., Mlodzik, M. y Wilson, C. (1999). Drosophila tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* **13**, 3244-3258.
- Goldstein, B. y Macara, I. G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* **13**, 609-622.
- Golic, K. G. y Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T. y Inagaki, M. (1999). Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* **274**, 25543-25549.
- Goulev, Y., Fauny, J. D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J. y Zider, A. (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in Drosophila. *Curr Biol* **18**, 435-441.
- Grifoni, D., Garoia, F., Bellosta, P., Parisi, F., De Biase, D., Collina, G., Strand, D., Cavicchi, S. y Pession, A. (2007). aPKCzeta cortical loading is associated with Lgl cytoplasmic release and tumor growth in Drosophila and human epithelia. *Oncogene* **26**, 5960-5965.
- Grifoni, D., Froldi, F. y Pession, A. (2013). Connecting epithelial polarity, proliferation and cancer in Drosophila: the many faces of lgl loss of function. *Int J Dev Biol* **57**, 677-687.
- Grzeschik, N. A., Parsons, L. M., Allott, M. L., Harvey, K. F. y Richardson, H. E. (2010). Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr Biol* **20**, 573-581.
- Gustafson, W. C., Ray, S., Jamieson, L., Thompson, E. A., Brasier, A. R. y Fields, A. P. (2004). Bcr-Abl regulates protein kinase Ciota (PKCiota) transcription via an Elk1 site in the PKCiota promoter. *J Biol Chem* **279**, 9400-9408.
- Haeckel, E. (1896). *The Evolution of Man: A Popular Exposition of the Principal Points of Human Ontogeny and Phylogeny*. New York: Appleton.
- Halaoui, R. y McCaffrey, L. (2014). Rewiring cell polarity signaling in cancer. *Oncogene*.

BIBLIOGRAFÍA

- Hamaratoglu, F., Willecke, M., Kango-Singh, M., Nolo, R., Hyun, E., Tao, C., Jafar-Nejad, H. y Halder, G. (2006). The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 8, 27-36.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hariharan, I. K. y Haber, D. A. (2003). Yeast, flies, worms, and fish in the study of human disease. *N Engl J Med* 348, 2457-2463.
- Hariharan, I. K. y Bilder, D. (2006). Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 40, 335-361.
- Harris, K. P. y Tepass, U. (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *J Cell Biol* 183, 1129-1143.
- Harris, T. J. y Peifer, M. (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 167, 135-147.
- Harris, T. J. y Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol* 170, 813-823.
- Harvey, K. F., Zhang, X. y Thomas, D. M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 246-257.
- Hay, B. A., Wolff, T. y Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 120, 2121-2129.
- Haynie, J. L. y Bryant, P. J. (1977). The effects of X-rays on the proliferation dynamics of Cells in the imagina wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch.* 183, 85-100.
- Hazelett, D. J., Bourouis, M., Walldorf, U. y Treisman, J. E. (1998). decapentaplegic and wingless are regulated by eyes absent and eyegone and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development* 125, 3741-3751.
- Herbert, J. M., Augereau, J. M., Gleye, J. y Maffrand, J. P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 993-999.
- Holz, A., Meise, M. y Janning, W. (1997). Aepithelial cells in *Drosophila melanogaster*: origin and cell lineage. *Mech Dev* 62, 93-101.
- Holland, P. W. (1999). The future of evolutionary developmental biology. *Nature* 402, C41-44.
- Hong, W. y Guan, K. L. (2012). The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol* 23, 785-793.

- Horikoshi, Y., Suzuki, A., Yamanaka, T., Sasaki, K., Mizuno, K., Sawada, H., Yonemura, S. y Ohno, S. (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J Cell Sci* **122**, 1595-1606.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. y Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* **122**, 421-434.
- Humbert, P., Russell, S. y Richardson, H. (2003). Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays* **25**, 542-553.
- Humbert, P. O., Grzeschik, N. A., Brumby, A. M., Galea, R., Elsum, I. y Richardson, H. E. (2008). Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene* **27**, 6888-6907.
- Hurov, J. B., Watkins, J. L. y Piwnicka-Worms, H. (2004). Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr Biol* **14**, 736-741.
- Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M. y Knoblich, J. A. (2004). Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during Drosophila embryogenesis. *Dev Cell* **6**, 845-854.
- Igaki, T., Pagliarini, R. A. y Xu, T. (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in Drosophila. *Curr Biol* **16**, 1139-1146.
- Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signaling. *Apoptosis* **14**, 1021-1028.
- Igaki, T., Pastor-Pareja, J. C., Aonuma, H., Miura, M. y Xu, T. (2009). Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in Drosophila. *Dev Cell* **16**, 458-465.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. y Yamamoto, D. (1997). The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-771.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, K. J. y Ohno, S. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* **143**, 95-106.
- Janody, F. y Treisman, J. E. (2006). Actin capping protein alpha maintains vestigial-expressing cells within the Drosophila wing disc epithelium. *Development* **133**, 3349-3357.
- Johnson, R. y Halder, G. (2014). The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 63-79.
- Karim, F. D. y Rubin, G. M. (1998). Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in Drosophila imaginal tissues. *Development* **125**, 1-9.

BIBLIOGRAFÍA

- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciano, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. y Evan, G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**, 544-548.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. y Cheng, N. S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-320.
- Kempkens, O., Medina, E., Fernandez-Ballester, G., Ozuyaman, S., Le Bivic, A., Serrano, L. y Knust, E. (2006). Computer modelling in combination with in vitro studies reveals similar binding affinities of *Drosophila* Crumbs for the PDZ domains of Stardust and DmPar-6. *Eur J Cell Biol* **85**, 753-767.
- Kim, N. G., Koh, E., Chen, X. y Gumbiner, B. M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11930-11935.
- Klebes, A. y Knust, E. (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 76-85.
- Kornberg, T. (1981). Engrailed: a gene controlling compartment and segment formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 1095-1099.
- Kovall, R. A. (2007). Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 117-127.
- Kusakabe, M. y Nishida, E. (2004). The polarity-inducing kinase Par-1 controls *Xenopus* gastrulation in cooperation with 14-3-3 and aPKC. *EMBO J* **23**, 4190-4201.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamouille, S., Xu, J. y Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-196.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J. y Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na⁺/K⁺-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* **459**, 1141-1145.
- Laprise, P. y Tepass, U. (2011). Novel insights into epithelial polarity proteins in *Drosophila*. *Trends Cell Biol* **21**, 401-408.
- Lawrence, P. A. (1992). *The Making of a Fly* Blackwell Scientific Publications.
- Lawrence, P. A. y Casal, J. (2013). The mechanisms of planar cell polarity, growth and the Hippo pathway: some known unknowns. *Dev Biol* **377**, 1-8.
- Lee, C. Y., Robinson, K. J. y Doe, C. Q. (2006). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* **439**, 594-598.
- Lee, S. J., Jung, Y. H., Oh, S. Y., Yong, M. S., Ryu, J. M. y Han, H. J. (2014). Netrin-1 induces MMP-12-dependent E-cadherin degradation via the distinct activation of PKC α and FAK/Fyn in promoting mesenchymal stem cells motility. *Stem Cells Dev.*

- Lee, T. y Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461.
- Lee, T. y Luo, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-254.
- Lee, Y. S. y Carthew, R. W. (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322-329.
- Leong, G. R., Goulding, K. R., Amin, N., Richardson, H. E. y Brumby, A. M. (2009). Scribble mutants promote aPKC and JNK-dependent epithelial neoplasia independently of Crumbs. *BMC Biol* **7**, 62.
- Leong, K. G. y Karsan, A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* **107**, 2223-2233.
- Li, R. y Gundersen, G. G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 860-873.
- Li, W., Cooper, J., Karajannis, M. A. y Giancotti, F. G. (2012). Merlin: a tumour suppressor with functions at the cell cortex and in the nucleus. *EMBO Rep* **13**, 204-215.
- Limb, G. A., Matter, K., Murphy, G., Cambrey, A. D., Bishop, P. N., Morris, G. E. y Khaw, P. T. (2005). Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am J Pathol* **166**, 1555-1563.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S. y Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10532-10537.
- Lis, J. T., Simon, J. A. y Sutton, C. A. (1983). New heat shock puffs and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell* **35**, 403-410.
- Lobry, C., Oh, P. y Aifantis, I. (2011). Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med* **208**, 1931-1935.
- Lowe, S. W., Cepero, E. y Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-315.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lu, H. y Bilder, D. (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **7**, 1232-1239.
- Lu, Y., Jamieson, L., Brasier, A. R. y Fields, A. P. (2001). NF-kappaB/RelA transactivation is required for atypical protein kinase C iota-mediated cell survival. *Oncogene* **20**, 4777-4792.
- Ma, J. y Ptashne, M. (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* **50**, 137-142.

BIBLIOGRAFÍA

- Maitre, J. L. y Heisenberg, C. P.** (2013). Three functions of cadherins in cell adhesion. *Curr Biol* **23**, R626-633.
- Mann, R. S. y Morata, G.** (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 243-271.
- Margulis, L.** (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.
- Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T. y Baum, B.** (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature* **484**, 542-545.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. y Mostov, K.** (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383-397.
- Martin-Belmonte, F. y Perez-Moreno, M.** (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 23-38.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. y Garcia-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-7893.
- Martin, F. A. y Morata, G.** (2006). Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **133**, 4421-4426.
- Martin, F. A., Herrera, S. C. y Morata, G.** (2009). Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **136**, 3747-3756.
- Matakatsu, H. y Blair, S. S.** (2006). Separating the adhesive and signaling functions of the Fat and Dachshous protocadherins. *Development* **133**, 2315-2324.
- Matthews, K. A., Kaufman, T. C. y Gelbart, W. M.** (2005). Research resources for *Drosophila*: the expanding universe. *Nat Rev Genet* **6**, 179-193.
- Mavrakakis, M., Rikhy, R. y Lippincott-Schwartz, J.** (2009). Plasma membrane polarity and compartmentalization are established before cellularization in the fly embryo. *Dev Cell* **16**, 93-104.
- McClure, K. D. y Schubiger, G.** (2005). Developmental analysis and squamous morphogenesis of the peripodial epithelium in *Drosophila* imaginal discs. *Development* **132**, 5033-5042.
- McEwen, D. G. y Peifer, M.** (2005). Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* **132**, 3935-3946.
- McGill, M. A., McKinley, R. F. y Harris, T. J.** (2009). Independent cadherin-catenin and Bazooka clusters interact to assemble adherens junctions. *J Cell Biol* **185**, 787-796.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. y Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-1768.

- Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. y Le Bivic, A. (2002).** Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol* **158**, 941-951.
- Mellman, I. y Nelson, W. J. (2008).** Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 833-845.
- Menendez, J., Perez-Garijo, A., Calleja, M. y Morata, G. (2010).** A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14651-14656.
- Menut, L., Vaccari, T., Dionne, H., Hill, J., Wu, G. y Bilder, D. (2007).** A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation. *Genetics* **177**, 1667-1677.
- Meyer, N., Kim, S. S. y Penn, L. Z. (2006).** The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* **16**, 275-287.
- Milan, M., Campuzano, S. y Garcia-Bellido, A. (1997).** Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5691-5696.
- Moberg, K. H., Schelble, S., Burdick, S. K. y Hariharan, I. K. (2005).** Mutations in erupted, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev Cell* **9**, 699-710.
- Mollereau, B., Perez-Garijo, A., Bergmann, A., Miura, M., Gerlitz, O., Ryoo, H. D., Steller, H. y Morata, G. (2013).** Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. *Cell Death Differ* **20**, 181.
- Morais-de-Sa, E., Mirouse, V. y St Johnston, D. (2010).** aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell* **141**, 509-523.
- Morata, G. y Ripoll, P. (1975).** Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* **42**, 211-221.
- Morata, G., Shlevkov, E. y Perez-Garijo, A. (2011).** Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*. *Dev Growth Differ* **53**, 168-176.
- Morata, G. y Herrera, S. C. (2013).** Eiger triggers death from afar. *Elife* **2**, e01388.
- Moreno, E., Basler, K. y Morata, G. (2002).** Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* **416**, 755-759.
- Moreno, E. y Basler, K. (2004).** dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-129.
- Morimura, S., Maves, L., Chen, Y. y Hoffmann, F. M. (1996).** decapentaplegic overexpression affects *Drosophila* wing and leg imaginal disc development and wingless expression. *Dev Biol* **177**, 136-151.
- Morrison, H. A., Dionne, H., Rusten, T. E., Brech, A., Fisher, W. W., Pfeiffer, B. D., Celniker, S. E., Stenmark, H. y Bilder, D. (2008).** Regulation of early endosomal entry by the *Drosophila* tumor suppressors Rabenosyn and Vps45. *Mol Biol Cell* **19**, 4167-4176.

BIBLIOGRAFÍA

- Moscat, J. y Diaz-Meco, M. T. (2000). The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep* 1, 399-403.
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T., Albert, A. y Campuzano, S. (2006). Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell* 23, 631-640.
- Murray, N. R., Jamieson, L., Yu, W., Zhang, J., Gokmen-Polar, Y., Sier, D., Anastasiadis, P., Gatalica, Z., Thompson, E. A. y Fields, A. P. (2004). Protein kinase Ciota is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. *J Cell Biol* 164, 797-802.
- Murray, N. R., Kalari, K. R. y Fields, A. P. (2011). Protein kinase Ciota expression and oncogenic signaling mechanisms in cancer. *J Cell Physiol* 226, 879-887.
- Nagase, H., Visse, R. y Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-573.
- Nagel, A. C., Maier, D. y Preiss, A. (2002). Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 212, 93-98.
- Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A. y Edgar, B. A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93, 1183-1193.
- Neumann, C. J. y Cohen, S. M. (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 124, 871-880.
- Newton, A. C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E395-402.
- Nogi, Y., Shimada, H., Matsuzaki, Y., Hashimoto, H. y Fukasawa, T. (1984). Regulation of expression of the galactose gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. II. The isolation and dosage effect of the regulatory gene GAL80. *Mol Gen Genet* 195, 29-34.
- Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J. y Aifantis, I. (2014). From Fly Wings to Targeted Cancer Therapies: A Centennial for Notch Signaling. *Cancer Cell* 25, 318-334.
- Oh, H., Reddy, B. V. y Irvine, K. D. (2009). Phosphorylation-independent repression of Yorkie in Fat-Hippo signaling. *Dev Biol* 335, 188-197.
- Oh, H. y Irvine, K. D. (2010). Yorkie: the final destination of Hippo signaling. *Trends Cell Biol* 20, 410-417.
- Oh, H. y Irvine, K. D. (2011). Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam. *Dev Cell* 20, 109-122.
- Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarle, S. A. y Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* 131, 3907-3920.
- Ooshio, T., Fujita, N., Yamada, A., Sato, T., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Nakata, S., Miki, A., Irie, K. y Takai, Y. (2007). Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *J Cell Sci* 120, 2352-2365.

- Pagliarini, R. A. y Xu, T. (2003). A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science* **302**, 1227-1231.
- Palomero, T., Sulis, M. L., Cortina, M., Real, P. J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S. L., Bhagat, G., Agarwal, A. M., Basso, G., Castillo, M., Nagase, S., Cordon-Cardo, C., Parsons, R., Zuniga-Pflucker, J. C., Dominguez, M. y Ferrando, A. A. (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* **13**, 1203-1210.
- Pan, D., Dong, J., Zhang, Y. y Gao, X. (2004). Tuberous sclerosis complex: from *Drosophila* to human disease. *Trends Cell Biol* **14**, 78-85.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* **19**, 491-505.
- Pantalacci, S., Tapon, N. y Leopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **5**, 921-927.
- Parker, P. J., Justilien, V., Riou, P., Linch, M. y Fields, A. P. (2014). Atypical protein kinase Ciota as a human oncogene and therapeutic target. *Biochem Pharmacol* **88**, 1-11.
- Parsons, L. M., Grzeschik, N. A. y Richardson, H. E. (2014). lgl Regulates the Hippo Pathway Independently of Fat/Dachs, Kibra/Expanded/Merlin and dRASSF/dSTRIPAK. *Cancers (Basel)* **6**, 879-896.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. y Garcia-Bellido, A. (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* **7**, 387-399.
- Pellettieri, J. y Sanchez Alvarado, A. (2007). Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu Rev Genet* **41**, 83-105.
- Peng, H. W., Slattery, M. y Mann, R. S. (2009). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev* **23**, 2307-2319.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. y Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591-5598.
- Perez-Garijo, A., Shlevkov, E. y Morata, G. (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* **136**, 1169-1177.
- Phillips, A. C., Ernst, M. K., Bates, S., Rice, N. R. y Vousden, K. H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* **4**, 771-781.
- Plant, P. J., Fawcett, J. P., Lin, D. C., Holdorf, A. D., Binns, K., Kulkarni, S. y Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol* **5**, 301-308.

BIBLIOGRAFÍA

- Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P. y Payre, F. (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* **4**, 782-789.
- Polesello, C., Huelsmann, S., Brown, N. H. y Tapon, N. (2006). The *Drosophila* RASSF homolog antagonizes the hippo pathway. *Curr Biol* **16**, 2459-2465.
- Polesello, C., Roch, F., Gobert, V., Haenlin, M. y Waltzer, L. (2011). Modeling cancers in *Drosophila*. *Prog Mol Biol Transl Sci* **100**, 51-82.
- Potter, C. J., Turechalk, G. S. y Xu, T. (2000). *Drosophila* in cancer research. An expanding role. *Trends Genet* **16**, 33-39.
- Potter, J. D. (2007). Morphogens, morphostats, microarchitecture and malignancy. *Nat Rev Cancer* **7**, 464-474.
- Rando, T. A. (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* **441**, 1080-1086.
- Read, R. D., Goodfellow, P. J., Mardis, E. R., Novak, N., Armstrong, J. R. y Cagan, R. L. (2005). A *Drosophila* model of multiple endocrine neoplasia type 2. *Genetics* **171**, 1057-1081.
- Reed, C. T., Murphy, C. y Fristrom, D. (1975). The ultrastructure of the differentiating pupal legs of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **178**, 285-302.
- Regala, R. P., Weems, C., Jamieson, L., Khoor, A., Edell, E. S., Lohse, C. M. y Fields, A. P. (2005). Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **65**, 8905-8911.
- Ribeiro, P., Holder, M., Frith, D., Snijders, A. P. y Tapon, N. (2014). Crumbs promotes expanded recognition and degradation by the SCFSlimb/beta-TrCP ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E1980-1989.
- Ribeiro, P. S., Josue, F., Wepf, A., Wehr, M. C., Rinner, O., Kelly, G., Tapon, N. y Gstaiger, M. (2010). Combined functional genomic and proteomic approaches identify a PP2A complex as a negative regulator of Hippo signaling. *Mol Cell* **39**, 521-534.
- Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. y Hafen, E. (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* **10**, 2759-2768.
- Ring, J. M. y Martinez Arias, A. (1993). puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Dev Suppl*, 251-259.
- Robinson, B. S., Huang, J., Hong, Y. y Moberg, K. H. (2010). Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in *Drosophila* via the FERM-domain protein Expanded. *Curr Biol* **20**, 582-590.
- Robinson, B. S. y Moberg, K. H. (2011). *Drosophila* endocytic neoplastic tumor suppressor genes regulate Sav/Wts/Hpo signaling and the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Cell Cycle* **10**, 4110-4118.

- Rodrigues, A. B., Zoranovic, T., Ayala-Camargo, A., Grewal, S., Reyes-Robles, T., Krasny, M., Wu, D. C., Johnston, L. A. y Bach, E. A. (2012). Activated STAT regulates growth and induces competitive interactions independently of Myc, Yorkie, Wingless and ribosome biogenesis. *Development* **139**, 4051-4061.
- Rodriguez-Boulan, E. y Macara, I. G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 225-242.
- Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H. P., Lee, C. Y. y Doe, C. Q. (2003). Drosophila aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol* **163**, 1089-1098.
- Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J., Boeckeler, K. y Parker, P. J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 103-112.
- Rosse, C., Lodillinsky, C., Fuhrmann, L., Nourieh, M., Monteiro, P., Irondelle, M., Lagoutte, E., Vacher, S., Waharte, F., Paul-Gilloteaux, P., Romao, M., Sengmanivong, L., Linch, M., van Lint, J., Raposo, G., Vincent-Salomon, A., Bieche, I., Parker, P. J. y Chavrier, P. (2014). Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E1872-1879.
- Rudrapatna, V. A., Cagan, R. L. y Das, T. K. (2012). Drosophila cancer models. *Dev Dyn* **241**, 107-118.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. y Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* **7**, 491-501.
- Salic, A. y Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2415-2420.
- Salvesen, G. S. (2002). Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ* **9**, 3-5.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H. y Halder, G. (2011). Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J* **30**, 2325-2335.
- Schleiden, M. J. (1838). Beiträge zur Phytogenesis. In *Müller's Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*, (ed., pp. 137-176. Berlin.
- Schwann, T. (1839). Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen, (ed. Berlin: Sander'schen Buchhandlung.
- Skalka, M., Matyasova, J. y Cejkova, M. (1976). Dna in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett* **72**, 271-274.

BIBLIOGRAFÍA

- Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. y Campuzano, S. (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* **166**, 549-557.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **3**, 176-188.
- St Johnston, D. y Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* **141**, 757-774.
- Staley, B. K. y Irvine, K. D. (2012). Hippo signaling in *Drosophila*: recent advances and insights. *Dev Dyn* **241**, 3-15.
- Stallings-Mann, M., Jamieson, L., Regala, R. P., Weems, C., Murray, N. R. y Fields, A. P. (2006). A novel small-molecule inhibitor of protein kinase Ciota blocks transformed growth of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Res* **66**, 1767-1774.
- Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* **200**, 448-464.
- Stewart, M., Murphy, C. y Fristrom, J. W. (1972). The recovery and preliminary characterization of X chromosome mutants affecting imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **27**, 71-83.
- Struhl, G. y Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527-540.
- Sullivan, W., Ashburner, M. y Hawley, R. S. (2000). *Drosophila protocols*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sun, G. y Irvine, K. D. (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev Biol* **350**, 139-151.
- Sun, G. y Irvine, K. D. (2013). Ajuba family proteins link JNK to Hippo signaling. *Sci Signal* **6**, ra81.
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., Miwa, Y. y Ohno, S. (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol* **14**, 1425-1435.
- Tamori, Y. y Deng, W. M. (2014). Compensatory cellular hypertrophy: the other strategy for tissue homeostasis. *Trends Cell Biol* **24**, 230-237.
- Tanentzapf, G. y Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* **5**, 46-52.
- Tanomoto, H., Itoh, S., ten Dijke P. y Tabata, T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol. Cell* **5**, 59-71.
- Tennessen, J. M. y Thummel, C. S. (2011). Coordinating growth and maturation - insights from *Drosophila*. *Curr Biol* **21**, R750-757.

- Tepass, U., Theres, C. y Knust, E.** (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787-799.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. y Fehon, R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in Drosophila. *Annu Rev Genet* **35**, 747-784.
- Tepass, U.** (2012). The apical polarity protein network in Drosophila epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 655-685.
- Tervonen, T. A., Partanen, J. I., Saarikoski, S. T., Myllynen, M., Marques, E., Paasonen, K., Moilanen, A., Wohlfahrt, G., Kovanen, P. E. y Klefstrom, J.** (2011). Faulty epithelial polarity genes and cancer. *Adv Cancer Res* **111**, 97-161.
- Thummel, C. S.** (2001). Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and Drosophila. *Dev Cell* **1**, 453-465.
- Tian, A. G. y Deng, W. M.** (2008). Lgl and its phosphorylation by aPKC regulate oocyte polarity formation in Drosophila. *Development* **135**, 463-471.
- Turkel, N., Sahota, V. K., Bolden, J. E., Goulding, K. R., Doggett, K., Willoughby, L. F., Blanco, E., Martin-Blanco, E., Corominas, M., Ellul, J., Aigaki, T., Richardson, H. E. y Brumby, A. M.** (2013). The BTB-zinc finger transcription factor abrupt acts as an epithelial oncogene in Drosophila melanogaster through maintaining a progenitor-like cell state. *PLoS Genet* **9**, e1003627.
- Tyler, D. M. y Baker, N. E.** (2007). Expanded and fat regulate growth and differentiation in the Drosophila eye through multiple signaling pathways. *Dev Biol* **305**, 187-201.
- Uhlirova, M., Jasper, H. y Bohmann, D.** (2005). Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a Drosophila tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13123-13128.
- Uhlirova, M. y Bohmann, D.** (2006). JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in Drosophila. *EMBO J* **25**, 5294-5304.
- Verghese, S., Waghmare, I., Kwon, H., Hanes, K. y Kango-Singh, M.** (2012). Scribble acts in the Drosophila fat-hippo pathway to regulate warts activity. *PLoS One* **7**, e47173.
- Vidal, M. y Cagan, R. L.** (2006). Drosophila models for cancer research. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 10-16.
- Vidal, M., Larson, D. E. y Cagan, R. L.** (2006). Csk-deficient boundary cells are eliminated from normal Drosophila epithelia by exclusion, migration, and apoptosis. *Dev Cell* **10**, 33-44.
- Vincent, J. P., Fletcher, A. G. y Baena-Lopez, L. A.** (2013). Mechanisms and mechanics of cell competition in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 581-591.
- Virchow, R.** (1859). Die cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebenlehre, (ed. Berlin: Verlag von August Hirschwald).

BIBLIOGRAFÍA

- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr. y Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-1558.
- von Baer, K. E. (1828). *Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion*. Königsberg: Bornträger.
- Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S. y Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* **138**, 3907-3914.
- Wang, Q., Hurd, T. W. y Margolis, B. (2004). Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem* **279**, 30715-30721.
- Webster, N., Jin, J. R., Green, S., Hollis, M. y Chambon, P. (1988). The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**, 169-178.
- Wei, S. Y., Escudero, L. M., Yu, F., Chang, L. H., Chen, L. Y., Ho, Y. H., Lin, C. M., Chou, C. S., Chia, W., Modolell, J. y Hsu, J. C. (2005). Echinoid is a component of adherens junctions that cooperates with DE-Cadherin to mediate cell adhesion. *Dev Cell* **8**, 493-504.
- Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A. y Allis, C. D. (1998). Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7480-7484.
- Willecke, M., Toggweiler, J. y Basler, K. (2011). Loss of PI3K blocks cell-cycle progression in a Drosophila tumor model. *Oncogene* **30**, 4067-4074.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. y Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila. *Cell* **82**, 67-76.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. y Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-1374.
- Woodhouse, E., Hersperger, E. y Shearn, A. (1998). Growth, metastasis, and invasiveness of Drosophila tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes. *Dev Genes Evol* **207**, 542-550.
- Woods, D. F. y Bryant, P. J. (1989). Molecular cloning of the lethal(1)discs large-1 oncogene of Drosophila. *Dev Biol* **134**, 222-235.
- Woods, D. F., Wu, J. W. y Bryant, P. J. (1997). Localization of proteins to the apico-lateral junctions of Drosophila epithelia. *Dev Genet* **20**, 111-118.
- Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. y Griffin, J. D. (2000). MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* **26**, 484-489.

- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C. y Xu, T. (2010). Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature* **463**, 545-548.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J. y Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* **114**, 445-456.
- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J. y Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell* **14**, 388-398.
- Xiao, H., Bai, X. H., Wang, Y., Kim, H., Mak, A. S. y Liu, M. (2013). MEK/ERK pathway mediates PKC activation-induced recruitment of PKC ζ and MMP-9 to podosomes. *J Cell Physiol* **228**, 416-427.
- Xu, L. y Deng, X. (2006). Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J Biol Chem* **281**, 4457-4466.
- Xu, T. y Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A. y Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* **13**, 734-743.
- Yamanaka, T. y Ohno, S. (2008). Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front Biosci* **13**, 6693-6707.
- Yoshihama, Y., Sasaki, K., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Ohtsuka, T., Hakuno, F., Takahashi, S., Ohno, S. y Chida, K. (2011). KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. *Curr Biol* **21**, 705-711.
- Yoshihama, Y., Chida, K. y Ohno, S. (2012). The KIBRA-aPKC connection: A potential regulator of membrane trafficking and cell polarity. *Commun Integr Biol* **5**, 146-151.
- Yu, F. X., Mo, J. S. y Guan, K. L. (2012a). Upstream regulators of the Hippo pathway. *Cell Cycle* **11**, 4097-4098.
- Yu, F. X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X. D., Mills, G. B. y Guan, K. L. (2012b). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **150**, 780-791.
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W. M. y Pan, D. (2010). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell* **18**, 288-299.
- Zaffran, S., Chartier, A., Gallant, P., Astier, M., Arquier, N., Doherty, D., Gratecos, D. y Semeriva, M. (1998). A *Drosophila* RNA helicase gene, pitchoune, is required for cell growth and proliferation and is a potential target of d-Myc. *Development* **125**, 3571-3584.

BIBLIOGRAFÍA

Zecca, M., Basler, K. y Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-2278.

Zecca, M., Basler, K. y Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-844.

Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B. y Jiang, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell* **14**, 377-387.

Zhao, B., Li, L., Lei, Q. y Guan, K. L. (2010). The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev* **24**, 862-874.

Zhao, B., Tumaneng, K. y Guan, K. L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol* **13**, 877-883.

Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C. Y., Yu, J. y Guan, K. L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev* **26**, 54-68.

